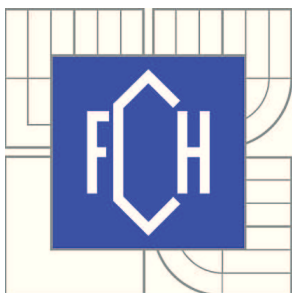


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIE MOŽNOSTI VYUŽITÍ ODPADNÍHO PEČIVA K BIOPRODUKCI VYBRANÝCH METABOLITŮ

A STUDY OF THE POSSIBILITY OF WASTE PASTRIES USING FOR THE BIOPRODUCTION OF
SELECTED METABOLITES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

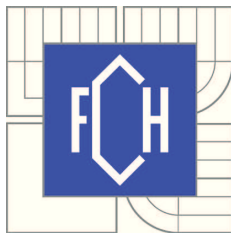
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. HELENA HUDEČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Mgr. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0822/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Helena Hudečková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Petra Šupinová	

Název diplomové práce:

Studie možnosti využití odpadního pečiva k bioprodukci vybraných metabolitů

Zadání diplomové práce:

- 1) výběr odpadu na bázi pečiva, volba mikrobiálních systémů a deklarace sledovaných metabolitů
- 2) rešerše literatury na téma práce
- 3) zpracování metodické části
- 4) provedení vlastních biokonverzí ve snaze o maximalizaci produkce vybraných metabolitů
- 5) aplikace analytických metod ke stanovení sledovaných látek v odebraných vzorcích
- 6) diskuse, vyhodnocení, závěr

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Helena Hudečková
Student(ka)

Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo studium možnosti využití odpadního pečiva k bioprodukcí vybraných metabolitů. Jako odpadní pečivo byl použit odpadní chléb dodaný kavárnou Zastávka. Chléb byl předupraven mletím na malé částice a dále z něj byla vytvořena 15 % w/v suspenze, která byla podrobena enzymatické hydrolýze. Na hydrolýzu byla použita α -amylasa pro ztekucení substrátu a po ní následovala glukoamylasa, která daný substrát sacharifikovala. Bylo provedeno několik způsobů hydrolýz, z nichž neoptimálnější byla dále použita na předúpravu substrátu před fermentací. Účinnost a průběh hydrolýz byly stanoveny spektrofotometrickou metodou podle Somogyiho-Nelsona. Konečné výtěžky glukosy z hydrolýz byly stanoveny metodou HPLC. Po enzymatické hydrolýze následovala fermentace, která byla provedena dvěma způsoby, a to s úpravou pH hydrolyzátu na hodnotu 5 a bez úpravy pH. Během fermentací byly prováděny odběry, ve kterých byl stanoven obsah glukosy, ethanolu a glycerolu metodou HPLC.

Fermentace probíhala za teploty 30 °C s použitím kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Nejvyššího výtěžku glukosy bylo dosaženo u hydrolýzy ve dvou krocích (70,28 g·l⁻¹), avšak pro fermentaci byla použita metoda směsné hydrolýzy („směsná 2“) s výtěžkem 67,94 g·l⁻¹. Nejvyššího výtěžku ethanolu bylo dosaženo během fermentace bez úpravy pH, a to 31,5 g·l⁻¹.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to study the possibility of using waste bread to bioproduction of selected metabolites. As bakery waste was used waste bread that came from coffee-house “Zastávka”. Bread was pre-treated by grinding into small particles and then it was made to form 15% w/v suspension, which was subjected to enzymatic hydrolysis. For the hydrolysis has been used the α -amylase for liquefaction of the substrate and that was followed by a glucoamylase which sacharificated the substrate. There have been several methods of hydrolysis from which was chosen the optimal method for pre-treatment of the substrate prior to fermentation. The effectivity and a process of hydrolysis were determined spectrophotometrically by Somogyi-Nelson method. Final yields of glucose from hydrolysis were determined by HPLC method. Enzymatic hydrolysis was followed by fermentation, which was carried out in two ways, namely by adjusting the pH of the hydrolyzate to pH 5, and without pH adjustment. During the fermentation was carried out sampling in which was determined the content of glucose, glycerol and ethanol by HPLC method.

The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* were used for the fermentation which was performed at 30 °C. High yield of glucose was achieved by hydrolysis in two steps (70,28 g·l⁻¹), but for the fermentation was used mixed hydrolysis (second method of mixed hydrolysis) with yield 67,94 g·l⁻¹. High ethanol yield was achieved during fermentation without treatment pH, namely 31,5 g·l⁻¹.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, odpadní pečivo, chléb, amylasy, hydrolýza.

KEYWORDS

Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, bakery waste, bread, amylases, hydrolysis.

HUDEČKOVÁ, H. *Studie možnosti využití odpadního pečiva k bioprodukci vybraných metabolitů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 93 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph. D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Mgr. Liboru Babákovi, Ph. D. za vedení a odborné rady, Ing. Petře Šupinové za ochotu a pomoc s praktickou částí v laboratoři. Dále PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph. D. za konzultaci a odborné rady, Mudr. Petru Canovovi a všem, kteří jakýmkoliv způsobem přispěli ke vzniku této práce.

OBSAH

Úvod.....	9
1 Teoretická část	10
1.1 Chléb	10
1.1.1 Výroba a složení chleba.....	10
1.1.2 Zvětrání chleba	11
1.1.3 Mikrobiální znehodnocení	12
1.1.4 Změny škrobu v chlebu a jiných cereálních výrobcích	12
1.2 Předúpravy a charakterizace vzorku	13
1.2.1 Mletí.....	13
1.2.2 Prosévání	14
1.3 Škrob.....	14
1.3.1 Amylosa.....	15
1.3.2 Amylopektin	15
1.3.3 Škrobová zrna	16
1.3.4 Vlastnosti a změny škrobu.....	17
1.4 Enzymatická hydrolýza.....	18
1.4.1 Amylolytické enzymy.....	19
1.4.2 α -amylasa.....	19
1.4.3 Glukoamylasa	21
1.4.4 Inhibitory amylas	23
1.5 Mikroorganismy produkující ethanol	23
1.5.1 Rod <i>Saccharomyces</i>	24
1.6 Lihové kvašení	26
1.7 Bioinženýrské charakteristiky.....	26
1.7.1 Techniky kultivace mikroorganismů	26
1.7.2 Růstová křivka mikroorganismů	27
1.8 Bioethanol.....	29
1.8.1 Biopaliva.....	29
1.8.2 Výroba ethanolu ze škrobnatých surovin	30
1.9 Analytické metody	31
1.9.1 Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi-Nelsona	31
1.9.2 Turbidimetrie	32
1.9.3 HPLC	33
2 Experimentální část.....	35
2.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje.....	35
2.1.1 Enzymy pro hydrolýzu odpadního chleba	35
2.1.2 Chemikálie.....	36

2.1.3	Kultura	36
2.1.4	Substrát	36
2.1.5	Přístroje a pomůcky	37
2.1.6	Software	37
2.2	Příprava roztoků	37
2.2.1	Inokulační a kultivační médium pro <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
2.2.2	Příprava roztoků na úpravu pH pro hydrolýzy	38
2.2.3	Příprava kalibračních roztoků glukosy a maltosy pro stanovení metodou Somogyi-Nelsona	38
2.2.4	Příprava roztoků pro stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi-Nelsona	39
2.2.5	Mobilní fáze pro přístroj HPLC	39
2.2.6	Příprava kalibračních roztoků glukosy, ethanolu a glycerolu pro stanovení metodou HPLC	39
2.3	Kultivace a stanovení růstové křivky	39
2.4	Předúprava vzorku	40
2.4.1	Mletí chleba	40
2.4.2	Sítová analýza velikosti částic	40
2.4.3	Příprava vzorku	40
2.5	Enzymatické hydrolýzy	40
2.5.1	Ztekucení	40
2.5.2	Sacharifikace	41
2.5.3	Kombinovaná hydrolýza	41
2.6	Fermentace	42
2.6.1	Analýza metodou Somogyi-Nelsona	42
2.6.2	Analýza metodou HPLC	42
2.7	Statistické zpracování výsledků	43
3	Výsledky a diskuse	44
3.1	Kultivace a stanovení růstových křivek	44
3.2	Sítová analýza velikosti částic	45
3.3	Enzymatické hydrolýzy	46
3.3.1	Ztekucení	46
3.3.2	Sacharifikace	56
3.3.3	Kombinovaná hydrolýza	69
3.4	Fermentace	73
Závěr		78
Literatura		80
Seznam použitých zkratk a symbolů		86
Seznam použitých veličin		87
Seznam obrázků		88

Seznam tabulek.....	89
Seznam grafů	91
Seznam příloh	93

ÚVOD

V 21. století, s přítomností supermarketů a řetězců rychlého občerstvení si mohou lidé z rozvinutých zemí dovolit nejen pořídit více potravin, ale bohužel je i vyhazovat. S kvalitnějším balením potravin si dnes lidé nejsou zcela vědomi toho, že nakupují více jídla, než spotřebují, čímž dochází k většímu plýtvání než v minulosti. Mnoho jídla, různého druhu, se proto stává odpadem. Potraviny, které se jím stanou lze jen těžko individuálně kvantifikovat, nicméně existují tři hlavní skupiny. Těmi jsou maso, ovoce a zelenina a pekařské výrobky. Z pekařských výrobků tvoří většinu odpadu chléb. [1]

Odpadním pečivem může být například nespotřebované pečivo z domácností, které je z různých důvodů již nepoživatelné. Další možností je pečivo z obchodních řetězců a různých podniků, které není prodáno a je vráceno zpět do pekáren nebo rovnou vyhozeno. Případně pečivo z pekáren, kde mohou zůstat neprodané produkty nebo vrácené z obchodů, které ačkoliv nejsou závadné, tak se již nemohou vrátit do prodeje. Pokud pečivo nebylo nijak kontaminováno, dá se použít na výrobu strouhanky. Nicméně zbytek odpadního pečiva se většinou dává zemědělcům jako krmivo pro zvířata nebo se vyhodí do odpadu. Podle směrnice EU o skládkách, by biologicky rozložitelný komunální odpad uložený na skládky měl být snížen od roku 1995 do roku 2020 na 35%. Začínají se proto vyvíjet studie na zpracování tohoto odpadu pro výrobu jiných využitelných surovin. [1]

Odpadní chléb lze využít jako substrát pro výrobu hned několika surovin. Byly provedeny studie možnosti použití odpadního chleba jako biomasu pro produkci glukosového sirupu, kyseliny mléčné a octové, ethanolu, aromatických sloučenin, amylasových enzymů, methanu, biovodíku a kyseliny jantarové. [1]

V této práci jsem se zaměřila na produkci ethanolu, jelikož jeho využití je relativně široké a různorodé, od petrochemického průmyslu po potravinářský, farmaceutický a kosmetický. V petrochemickém průmyslu nachází uplatnění jako aditivum do tradičních fosilních paliv, kde zvyšuje oktanové číslo a snižuje množství emisí CO₂. V kosmetickém průmyslu se používá na výrobu různých masážních přípravků, ústních, pleťových a vlasových vod, přípravků po holení nebo jako rozpouštědlo silic do parfémů, aj.. Ve farmacii slouží především na výrobu desinfekčních přípravků a v potravinářském průmyslu nachází uplatnění při výrobě lihovin. [1]

Cílem této práce tedy byla optimalizace enzymatické hydrolýzy tak, aby škroby obsažené v odpadním chlebu byly co nejvíce rozštěpeny na jednoduché sacharidy. Produkty hydrolýzy byly použity na fermentaci a její optimalizaci k získání co největšího množství ethanolu pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Chléb

Chléb patří mezi základní potraviny. První zmínky jsou známy z Egypta, kde se okolo roku 4000 let př. n. l. pekl v podobě placky, do které byl přidán zákvas. V současnosti je tento typ nazýván jako Arabský či Pita chléb. [1]

Připravuje se pečením, pařením nebo smažením těsta. Hlavními složkami těsta jsou mouka a voda, dále se přidává jedlá sůl a kvásek. Kvásek je možno nahradit či doplnit pekařským droždím. Chléb má jedinečnou strukturu, upečený bochník se skládá ze dvou různých vrstev. Vnější, tvrdá "kůrka" obklopuje vnitřní, měkkou a porézní "středku". Některé druhy chleba jsou obohaceny o koření (např. kmín) a zrna (sezam, mák), které slouží k vylepšení chuti i dekoracím účelům. [1]

Z výživového hlediska se jedná o potravinu s vysokou nutriční hodnotou. Nutriční složení různých druhů chleba se liší, ale obvykle 100 g bílého chleba obsahuje okolo 50 g sacharidů (z toho 47 g je ve formě škrobu), 37 g vody, a asi 8 g bílkovin. Díky složení můžeme chléb označit jako kompletní zdroj výživy. [1]

1.1.1 Výroba a složení chleba

Na výrobu chleba se v pekařské technologii používají dva druhy těsta. Pšeničné se vyrábí současným mícháním všech surovin, a to pšeničné mouky, droždí a soli. U výroby pšeničnožitného těsta se suroviny přidávají a míchají postupně. Na 100 dílů mouky se obvykle přidává 35-80 dílů vody, podle vaznosti mouky. Droždí se přidává od 0,5 do 4 % a soli 0 až 2,5 % hmotnosti mouky. Až 143 kg chleba lze vyrobit ze 100 kg mouky. [2]

Dle předběžných údajů Českého statistického úřadu se v roce 2012 v ČR vyrobilo asi 306 205 tun chleba a jedna osoba ročně zkonsumovala asi 41,3 kg chleba. [3, 4]

Výroba chleba se skládá z několika fází:

1. příprava kvasu a hnětení
2. kynutí těsta,
3. formování těsta,
4. pečení,
5. chlazení, balení, expedice. [2]

Při přípravě těsta musí být použita předeřhřátá mouka podle druhu chleba (pšeničná, špaldová, žitná). Vodu je možno nahradit mlékem, podmáslím, syrovátkou či jogurtem. Jako kypřící přípravek se ve směsi může vyskytovat droždí, kvas nebo jejich kombinace. Další přísady se liší podle připravovaného chleba. V pekárnách můžeme kromě základních surovin najít i kmín, různá semínka (např. slunečnice, sezam, len), česnek, cibuli, různé bylinky, škvarky a další. [2]

Hlavní význam v pekařské výrobě má mléčné kvašení. Suspenze žitné mouky a vody, ve které se rozmnožují heterofermentativní bakterie mléčného kvašení, se nazývá kvas. Jsou zde obsaženy také kvasinky. Součinností obou druhů mikroorganismů dochází současně k alkoholové i mléčné fermentaci. Vznikající oxid uhličitý umožňuje bobtnání těsta. Kvas slouží nejen jako kypřidlo, ale dodává také chuť. Po smíchání všech přísad se těsto hněte asi 1 minutu a začíná kynutí. [2]

Při kynutí dochází ke zvětšování objemu vyvíjením oxidu uhličitého. Chléb se stává stravitelnějším, protože dochází k štěpení škrobu. Během kynutí dochází také k alkoholové fermentaci. Při těchto dvou pochodech vznikají dextriny, disacharidy, monosacharidy, alkoholy, oxid uhličitý a kyseliny (např. kyselina mléčná, jantarová), které dodávají těstu chuť a vůni. Při fermentaci může dojít k přebytku kyseliny mléčné a jako vedlejší produkty mohou vznikat kyseliny máselná a octová, které jsou nežádoucí kvůli nepříjemné pachuti. Chléb musí kynout dvakrát, což znamená, že po prvním kynutí se celý proces opakuje. Po vykynutí je těsto formováno, tj. dávkováno do ošatek vysypaných moukou. [2]

Poslední fází výroby chleba je pečení v průběžné peci, kde se teplota při pečení mění. Nejprve je vyšší okolo 280 až 340 °C, poté se snižuje na 200 °C a následně se znovu zvyšuje. Po upečení se chleba potírá vodou, aby došlo k vytvoření lesklé kůrky. Hnědá barva kůrky je způsobena tvorbou karamelu. Nakonec se nechá vychladnout. Po vychlazení se provádí krájení a balení, je-li to žádáno, a následuje expedice. [2]

Správný chleba by měl být souvisle zakulacený bez prasklin. Kůrka by měla mít kaštanovou barvu, vysokou 2 až 5 mm, neměla by být bledá ani spálená, bez cizích těles např. sazí, slámy a s charakteristickou vůní. Střed chleba by neměl být mazlavý a obsahovat hrudky. Na každém chlebu musí být vyznačena doba balení, minimální trvanlivosti, hmotnost, složení a označení výrobce. Mezi nejčastější druhy chleba patří: pšeničný, žitný, kmínový, celozrnný, slunečnicový, cibulový, česnekový, grahamový a další. [2]

1.1.2 Zvětrání chleba

I přes nižší pórovitost kůrky, která působí jako ochranná vrstva při výrobě a umožňuje střídce zachování vlhkosti, má chléb relativně krátkou trvanlivost. Během skladování dochází k různým fyzikálním a chemickým změnám: tvrdnutí střídky, změny chuti, aroma, nasákavosti, krystalinity, sytosti a obsahu rozpustného škrobu. Tyto změny způsobují zhoršení kvality chleba známé jako zvětrání, které však ovlivňuje pouze senzorické vlastnosti. Zvětralý výrobek je stále zdravotně nezávadný a bohatý na živiny, ovšem pro spotřebitele již není atraktivní a tento chléb končí jako odpad. To způsobuje významnou ekonomickou ztrátu a rozšiřuje problémy s potravinovým odpadem. [5, 6]

Mezi dva hlavní rysy zvětrání patří ztráta vlhkosti a retrogradace škrobu. Během pečení se teplota uvnitř střídky pohybuje v rozmezí 95 °C až 98 °C, což umožňuje gelovatění škrobu a absorpci vody. Gelovatění škrobu je možné při teplotách nad 70 °C. Vlhkost se při skladování ztrácí vlivem migrace vody ze střídky do kůry. Během tohoto procesu se střídka vysušuje a tvrdne, zatím co kůrka váže uvolněnou vodu ze střídky a měkne až kožnatí. [1]

Po ochlazení škrob přechází z gelovité struktury zpět do struktury krystalické, ve které se původně nacházel v mouce. Tento jev se nazývá retrogradace. Předpokládá se, že to je hlavní příčina zvětrání. Dvě hlavní složky škrobu, amylóza a amylopektin, se během retrogradace chovají odlišně. Amylóza retrograduje během několika hodin po pečení a amylopektin zůstává stabilní mnohem déle, obvykle po dobu několika dnů. [1]

Retrogradace škrobu je závislá na čase i teplotě. Nejrychleji probíhá při nízkých teplotách těsně nad bodem mrazu. Navzdory všeobecné domněnce, chlazení chleba (při 4 °C) urychluje zvětřování ve srovnání s uchováváním při pokojové teplotě. Ke zvětřování téměř nedochází při teplotě - 20 °C nebo nižší. Nízké teploty totiž významně snižují aktivitu vody, což zpomaluje přeskupování škrobových molekul, a proto jsou tyto teploty vhodné pro dlouhodobé uchovávání chleba. Stejného účinku může být dosaženo i přidáním přísad, které snižují aktivitu vody (např. sůl a cukr) nebo vážou vodu (např. hydrokoloidy a proteiny). Přidání povrchově aktivních látek nebo tepelně stabilní α -amylázy do chlebové směsi může zpomalit rychlost chlazení. [1]

1.1.3 Mikrobiální znehodnocení

Vysoká vlhkost (asi 40%) a vodní aktivita a_w (0,94 - 0,97) nejen zvyšují atraktivitu pro spotřebitele, ale také náchylnost vůči napadení plísněmi. Kontaminace chleba plísněmi je způsobena výlučně sekundárně po upečení, jelikož teploty během pečení se pohybují kolem 200 °C. Mikrobiální znehodnocení je hlavní problém při snížení kvality pečiva a představuje ztrátu 15 % produktů. Závisí na ročním období, typu vzniklého produktu a metodě zpracování. [1, 7, 8, 9]

K zamezení znehodnocení a zajištění bezpečnosti potravin pekaři používají konzervanty, i když jejich použití není spotřebiteli žádané. Nejběžnější potravinové konzervanty jsou:

- propionová kyselina – inhibuje plísně a spory bakterií rodu *Bacillus*, v menší míře kvasinky,
- kyselina sorbová – účinnější než kyselina propionová, inhibuje plísně i kvasinky, kromě chleba se používá u jemného pečiva a cukrářských výrobků,
- kyselina benzoová – i když se využívá i při výrobě chleba, je spojena spíše s konzervací ovoce. [1, 7, 8]

I s přidavkem konzervačních látek je většina chlebů stále náchylná ke znehodnocení mikroorganismy, včetně plísní rodu *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucorales*, a *Neurospora*. [1]

1.1.4 Změny škrobu v chlebu a jiných cereálních výrobcích

V potravinách se škrob nachází současně s dalšími látkami, jako jsou voda, cukry, lipidy, proteiny, soli a kyseliny, které mohou ovlivňovat jeho želatinaci. [10]

Zhruba 5 až 10 % škrobových zrn je mechanicky poškozeno během mletí obilí, a ta jsou při kynutí přednostně hydrolyzována amylasami (tzv. diastasou mouky). Při kynutí je škrob částečně hydrolyzován α -amylasou a β -amylasou na maltosu, která je dále maltasou rozložena až na glukosu. [10]

Želatinace škrobu neprobíhá u výroby chleba a pečiva v takové míře, jako například u vaření pudingu, vzhledem k menšímu množství přítomné vody. Výsledný stupeň želatinace škrobu a konzistence střídka je závislý od množství vody přidané k zadělávání těsta, původu mouky (chemického složení), množství tuků, emulgátorů a dalších faktorech. [10]

Chléb a pečivo obecně mají menší obsah škrobu po pečení a vyšší obsah produktů štěpení, jakými jsou dextriny a nižší cukry, než v těstě. To je způsobeno pečením, během kterého probíhá poměrně dlouhá enzymová hydrolýza škrobu endogenní α -amylasou a β -amylasou. Produkty hydrolýzy vážou část vody, která by se případně podílela na želatinaci škrobu. Při pomalejším pečení za nižších teplot vzniká více nižších cukrů, které podléhají dále neenzymovému hnědnutí, což zapříčiňuje tmavě hnědou barvu střídky a výrazné aroma.[10]

V chlebové kůrce vystavené teplotám pečení okolo 160 až 180°C vznikají tzv. pražné dextriny. Jejich vznik je důsledkem neenzymové hydrolýzy škrobu na menší celky kondenzující ve větší molekuly, ve kterých jsou glukosové jednotky vázány glykosidickými α -(1,6) nebo etherovými vazbami. Tyto vazby nejsou štěpeny běžnými sacharasami v trávicím traktu. [10]

Na rozsah želatinace mají vliv i lipidy a monoacylglyceroly používané jako emulgátory, které tvoří s amylosou inkluzní sloučeniny zpomalující bobtnání škrobových granulí. Menší vliv na želatinaci mají nízké koncentrace chloridu sodného, který je při výrobě používán. K želatinaci dochází také při extruzi. Jedná se o technologický proces zpracování potravin (ale i krmiv a jiných produktů), kdy se zvlhčené škrobnaté materiály s vysokým obsahem bílkovin a vlákniny plastifikují. Tepelně se upravují kombinovaným působením tlaku, tepla a mechanických stříhových sil. Tento proces probíhá v zařízení nazývaném extrudér. Zde se surovina stlačuje v extruzním válci pomocí šneku, čímž dochází k jejímu zahřátí, následnému zmazovatění škrobu a denaturaci bílkovin. [10, 11]

1.2 Předúpravy a charakterizace vzorku

Ačkoliv bylo provedeno několik studií s fermentacemi odpadního chleba, nebyl zatím vytvořen jednotný postup pro jeho předúpravu jako suroviny využívané v zavedeném bioproduktu, jako tomu je u jiných surovin již využívaných. Chléb je vhodným substrátem pro fermentace různého druhu, jelikož je bohatý na škrob, bílkoviny a další živiny. Aby se tyto živiny zpřístupnily především pro mikroorganismy, je lepší odpadní chléb redukovat na menší částice. Zmenšení částic také zvýší účinnost enzymatické reakce. Vhodnou metodou pro redukci rozměrů odpadního pečiva je například mletí. [1]

1.2.1 Mletí

Mechanická desintegrace tuhých materiálů má hned několik názvů, které se používají, a to drcení, mletí, zdrobňování, rozpojování, redukce rozměrů, aj.. Rychlost chemických a fyzikálních procesů je mnohdy závislá na velikosti mezifázového povrchu. Pokud se těchto procesů účastní tuhá látka, je vhodné zvětšit její povrch rozmělněním. Tím se rozumí zmenšení rozměrů tuhých částic a zvětšení celkového povrchu materiálu, navíc se i změní rozdělení velikosti částic (tzv. granulometrické složení). [12, 13]

Hlavními důvody pro desintegraci částic je tedy zvýšení relativního poměru povrchu částice k jejímu objemu, čímž dojde ke zvýšení intenzity a rychlosti mezifázového přestupu hmoty a tepla. Dalším důvodem je také sjednocení částic různých materiálů pro vzájemně dokonalejší promíchávání. [12]

1.2.2 Prosévání

Prosévání je jedna z metod využívaných k třídění tuhých granulovaných materiálů podle velikosti. Dále mohou být tříděny podle hmotnosti, hustoty, tvaru nebo některého z charakteristických rozměrů částic. Třídění proséváním je v praxi nejvyužívanější a nejjednodušší metoda pro zjištění a charakterizování granulačního spektra souboru částic i pro separování jejich jednotlivých velikostních frakcí. [12]

Pro charakterizaci rozemletých částic byla použita síťová analýza se sadou sít. Nejjednodušším sestavením sady sít je seřazení od síta s největšími otvory po síto s otvory nejmenšími. Jedna velikostní frakce je oddělena od druhé přepadem přes jednotlivá síta, kdy na prvním (horním) síti zůstávají částice největší a propadem posledním sítem se získají částice nejmenší. Propad z většího síta na menší je automatický, takže síta mohou být sestavena přímo nad sebou. [12]

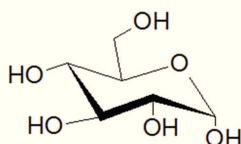
1.3 Škrob

Škrob je důležitou složkou lidské potravy a pro tento účel se chemicky a enzymaticky zpracovává do mnoha různých výrobků, jakými jsou například škrobové hydrolyzáty, glukosové sirupy, fruktosa, maltodextrinové deriváty nebo cyklodextriny, které se využívají v potravinářském průmyslu. Kromě toho mohou být vyprodukované cukry dále použity k výrobě ethanolu. I přes širokou škálu rostlin použitelných pro produkci škrobu, je pouze pár využitelných pro průmyslovou výrobu, mezi ně patří hlavně kukuřice, tapioky, brambory a pšenice. Ze sacharidických polymerů se škrobu v současné době věnuje největší pozornost právě kvůli jeho užitečnosti v různých potravinových výrobcích. Významně přispívá k texturním vlastnostem mnoha potravin a je široce využíván v potravinářských a průmyslových aplikacích jako zahušňovač, koloidní stabilizátor, želatinační činidlo a činidlo k uchování vody. [14, 15, 16, 17]

Škrob je polymer složený z glukosových jednotek navzájem propojených prostřednictvím kyslíku umístěného na C_1 , což se nazývá glykosidická vazba. Glykosidická vazba je stabilní při vysokých hodnotách pH, avšak při nízkých hodnotách pH hydrolyzuje. Na konci polymerního řetězce se nachází latentní aldehydická skupina. Tato skupina je známa jako redukující konec. [16]

Rostliny vytváří směs gluků, které jsou součástí škrobu a také hlavní zásobní látkou rostlin. Slouží jako pohotovostní zásoba glukosy. Fotosynteticky vzniklá glukosa se ukládá ve formě škrobu, což je výhodné z hlediska snížení vysokých osmotických intracelulárních tlaků v buňkách. Nachází se v organelách cytoplazmy zvaných plastidy, na rozdíl od jiných strukturních polysacharidů nacházejících se v buněčných stěnách. V pletivech se v malém množství vyskytuje v chloroplastech a ve velkém množství v amyloplastech. Škrobová zrna či granule mají druhově specifický a geneticky daný tvar i rozměry. [10, 18]

Většina škrobů se skládá ze směsi amylosy a amylopektinu. Jedná se o homopolysacharidy složené molekulami α -D-glukopyranosy v 4C_1 (židličkové) konformaci, které se nejčastěji vyskytují v poměru 1:3. [10]

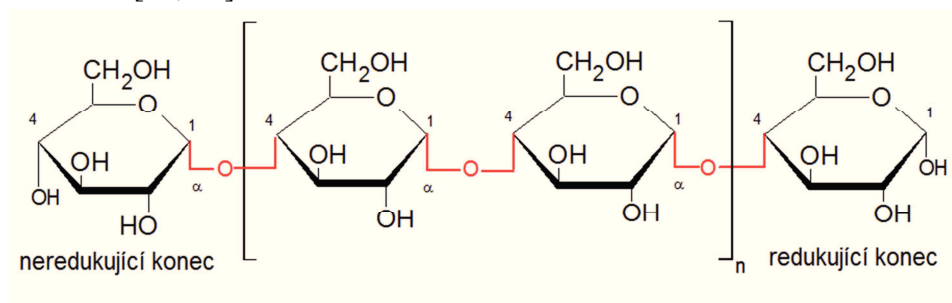


Obrázek 1 - Struktura α -D-glukopyranosy v 4C_1 (židličkové) konformaci

1.3.1 Amylosa

Amylosa je lineární polymer obsahující až 6 tisíc glukosových jednotek spojených $\alpha(1,4)$ glykosidickými vazbami. Dochází u ní v omezené míře také k větvení, asi na deseti místech molekuly. Počet glukosových zbytků bývá označován také jako stupeň polymerace, což se může lišit podle původu amylosy. Například amylosa z bramborového nebo tapiokového škrobu má stupeň polymerace 1000 až 6000, zatímco u amylosy z kukuřice nebo pšenice se stupeň polymerace pohybuje mezi 200 až 1200. Obsah amylosy ve škrobu se může pohybovat zhruba mezi 0 až 75 %, ale typická hodnota je 20 až 25 %. Molekulová hmotnost je asi 180 až 1000 kDa. [10, 16]

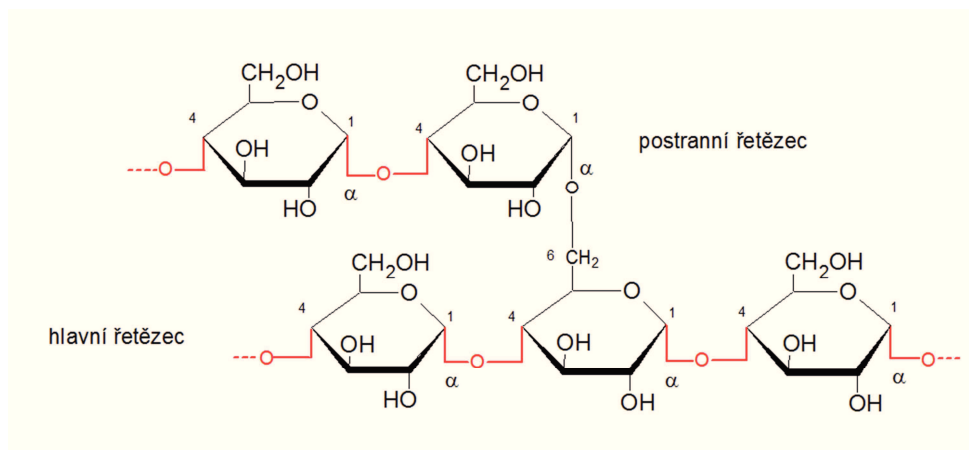
Struktura amylosy obsahuje jeden redukující konec. I když je α -amylosa isomerem celulosy, má velmi odlišné strukturní vlastnosti. Ty jsou dány β -glykosidovými vazbami v celuloze způsobujícími otočení každého dalšího glukosového zbytku o 180° od předcházejícího. Výsledkem takového působení vzniká polymer s navzájem propojenou rozvinutou konformací. V α -amylose vytváří α -glykosidové vazby nepravidelně agregované šroubovicové konformace. Ve vodě a neutrálních roztocích je svinutá náhodně, místy s helikální strukturou a tvoří levotočivou šroubovici, kdežto v alkalických roztocích převažuje globulární struktura. [10, 18]



Obrázek 2 - Struktura amylosy [10]

1.3.2 Amylopektin

Molekula amylopektinu je tvořena krátkými řetězci složenými z glukosových jednotek vázaných $\alpha(1,4)$ vazbami. Z nich se dále pomocí vazeb $\alpha(1,6)$ asi po 24 až 30 glukosových jednotkách větví postranní řetězce. Průměrný počet větvících se míst v amylopektinu je okolo 5 %, což se liší podle jeho původu. Výjimečně se můžou vyskytovat i vazby $\alpha(1,3)$. Stupeň polymerace amylopektinu je okolo 50 až 100 tisíc a molekulová hmotnost se pohybuje mezi 10 až 200 MDa. Kompletní molekula amylopektinu obsahuje v průměru okolo 2 milionů glukosových jednotek, čímž se stává jednou z největších molekul v přírodě. Nejčastěji uznávaným modelem struktury amylopektinu je skupinový model, kde postranní řetězce jsou uspořádány ve skupinách na delších hlavních řetězcích. Na molekule amylopektinu se nachází jeden redukující konec hlavního řetězce. [10, 16, 18]



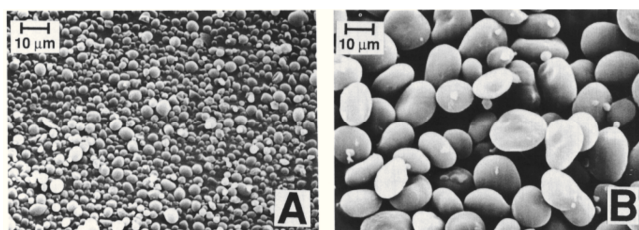
Obrázek 3 - Struktura amylopektinu [10]

1.3.3 Škrobová zrna

Škrobová zrna se liší ultrastrukturou podle toho, z jakého rostlinného zdroje pochází. Obecně však mají společný model, kde základ tvoří radiálně uspořádané molekuly amylopektinu, které jsou ve tvaru disku a jejichž neredukující konce směřují ven tak, že tvoří povrch zrna. [10]

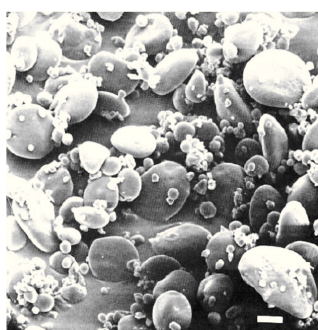
V částech, kde se vyskytují neredukující konce a ve střední části řetězců, dochází k tvorbě antiparalelních dvojíh šroubovic s uspořádanou (krystalickou) trojrozměrnou strukturou. Avšak v oblastech větvení jednotlivých řetězců má amylopektin a amylosa strukturu neuspořádanou, neboli amorfni. Škrobová zrna jsou tedy uspořádány do amorfnih a krystalickych struktur, které se pravidelně střídají. V hlízových a kořenových škrobech, jsou krystalické struktury složeny pouze z amylopektinu, zatímco amylosa je v oblasti amorfni. V cereálních škrobech je amylopektin také důležitou součástí krystalické struktury. Amylosa u cereálních škrobů je v komplexu s lipidy, z důvodu slabé krystalické struktury a posílení zrna. [10, 16]

Jsou rozeznávány 4 polymorfni formy škrobu podle stupně krystalinity, a to A, B, C a V. Forma A je nejstabilnější a nachází se u cereálních škrobů, kromě vysoce amylosových. Další forma, označovaná jako B, je nejméně stabilní a nachází se u škrobů kořenné zeleniny, brambor a u vysoce amylosových škrobů v obilovinách, kde obsah amylosy je vyšší než 40 %. V luštěninách se nachází další forma, tzv. C, která je zřejmě kombinací forem A a B. Tato forma vzniká totiž z formy B u želatinovaných škrobů s amorfni strukturou při retrogradaci a následně přechází na formu A. Poslední forma typu V se nachází v želatinovaných škrobech s obsahem lipidů, kde interaguje amylosa s mastnými kyselinami. [10]



Obrázek 4- Škrobová zrna typu A a B [19]

V jistých částech molekuly škrobu se tvoří levotočivé šroubovice amylosy, která je vázána na amylopektin, jejichž neredukující konce směřují na povrch zrna. Tyto šroubovice se nacházejí především v amorfních oblastech, zároveň s molekulami lipidů, jejichž mastné kyseliny jsou vsunuty do helikálních částí molekul amylos. Dochází tak ke vzniku nestechiometrických komplexů, tzv. inklusních sloučenin. Do integrální součásti zrna dále patří také malé množství proteinů s relativní molekulovou hmotností 5 až 97 kDa. Proteiny jsou lokalizovány převážně v povrchových vrstvách zrn. [10]



Obrázek 5- Elektronový mikrosnímek škrobových zrn pšeničného škrobu [20]

1.3.4 Vlastnosti a změny škrobu

Mezi nejvýznamnější vlastnosti škrobu z fyzikálního hlediska patří schopnost bobtnání, mazovatění a retrogradace. [21]

Bobtnání škrobu

Ve vodě jsou škrobová zrna nerozpustná, avšak ve studené vodě mírně bobtnají. Jsou schopna přijmout asi 30 % vody (vzhledem k hmotnosti škrobu). Se zvyšující se teplotou nabývá bobtnání škrobových zrn na intenzitě a pokračuje i s časem při stejné teplotě. Dalším přijímáním vody zrno postupně začíná ztrácet svou původní strukturu a v určitém rozmezí teplot a po určité době začíná docházet k tzv. mazovatění. [21]

Mazovatění škrobu

Zahříváním suspenze škrobu ve vodě dochází k adsorpci vody a mírnému bobtnání zrn až do 60 °C. Tato teplota je nazývána počáteční teplota mazovatění a po jejím překročení dochází k narušení celistvosti škrobových zrn a děj přestává být reverzibilní. Začínají se velmi intenzivně rozrušovat vodíkové můstky mezi molekulami, škrobová zrna zvětšují svůj objem a uvolní se amylosa, která dále difunduje do roztoku. Dalším zvyšováním teploty hydratace pokračuje a nabobtnalá škrobová zrna ztrácejí svou integritu praskáním a roztrháváním. V intervalu 60 až 75 °C jsou postupně zasažena všechna přítomná zrna. [21, 22, 23]

Želatinaci neboli mazovatění, lze tedy charakterizovat jako proces, při kterém molekuly škrobu dispergované ve vodném médiu začnou reasociovat a vytvářet trojrozměrné síťové struktury. Jedná se o ireverzibilní děj. [23]

Po zmazovatění veškerého škrobu začne viskozita při neustálém míchání směsi klesat. Po zchladnutí gelu se začnou molekuly amylosy a amylopektinu spolu zpětně asociovat a dojde i ke zvýšení viskozity. Na mazovatění má také vliv pH roztoku, přítomnost dalších složek, jakými jsou například soli, tuky, bílkoviny. Důležitou roli při mazovatění škrobu hraje i poměr škrobu a vody. Teploty mazovatění se liší podle původu škrobu. Obecně se pohybují v rozmezí 55 až 70 °C. Mezi škroby s nejnižšími teplotami mazovatění patří například škroby obilné. [21, 22]

Retrogradace škrobu

Vzhledem k tomu, že škrobové gely, pasty a koloidní roztoky nejsou v termodynamické rovnováze, dochází po nějaké době stání ke změnám jejich struktury a reologických vlastností. Důvodem je tvorba intermolekulárních vodíkových vazeb hlavně mezi amylosami a velmi málo u amylopektinu. Tento děj se nazývá retrogradace a dochází při něm ke vzniku dvoufázového systému pevná látka-kapalina. Největší vliv na rychlost a rozsah retrogradace má obsah a stupeň polymerace přítomné amylosy v systému, dále teplota, pH, obsah anorganických solí, povrchově aktivních látek, a jiných podobných látek. U škrobů cereálních se projevuje retrogradace daleko více než u škrobů hlízových. [22]

1.4 Enzymatická hydrolýza

Kvasinky mají schopnost přímo zkvasit pouze monosacharidy, konkrétně hexosy (glukosa, fruktosa, mannosa), a disacharidy (sacharosa, maltosa, méně laktosa a melibiosa). Proto se škroby před lihovarským zpracováním běžnými kvasinkami musí hydrolyzovat na jednoduché cukry. Jelikož kvasinky nedisponují vlastními hydrolytickými enzymy, musí být použity enzymové preparáty či kyseliny. Před samotnou fermentací tedy musí nastat tzv. enzymová či kyselá hydrolýza. [24, 25]

V minulosti se pro tyto účely připravoval speciální slad vyznačující se vysokou aktivitou, který byl později nahrazen zeleným sladem ze sladoven. V dnešní době se již výhradně používají enzymové preparáty. Pro enzymatickou hydrolýzu škrobu se využívá amylolytických enzymů, konkrétně kombinace α -amylasy pro ztekucení škrobu a glukooamylasy či β -amylasy ke zcukření. [24, 25]

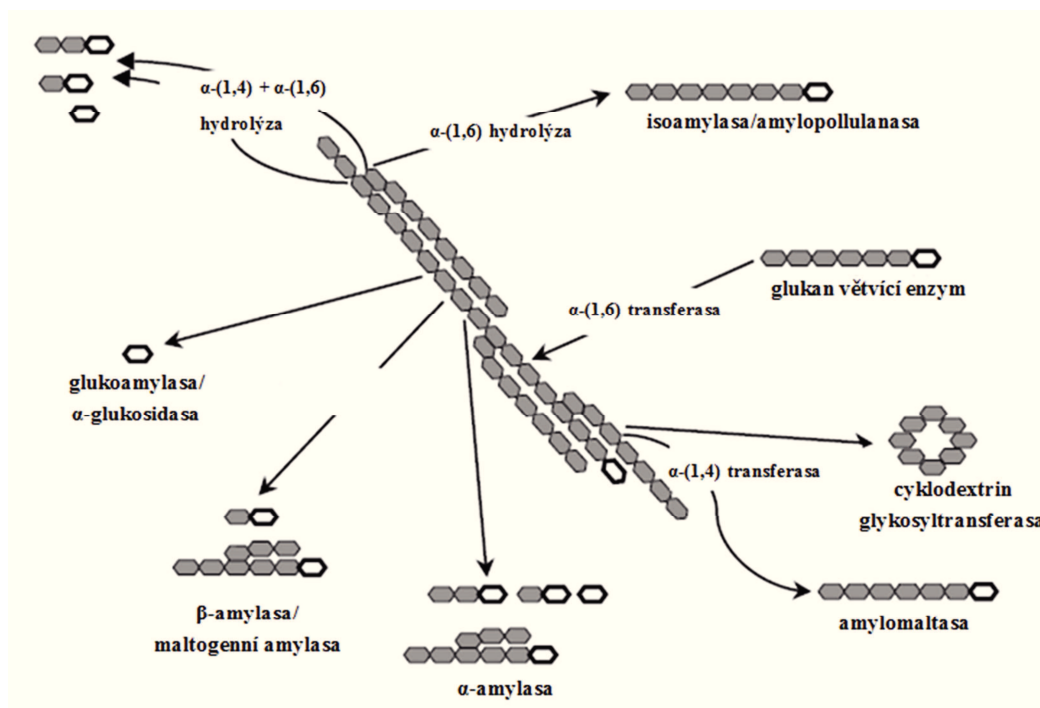
Ačkoliv je zvládnuta i kyselá hydrolýza škrobu, není příliš využívána, jelikož dochází ke vzniku vedlejších produktů hydrolýzy, které mají inhibiční účinky na mikroorganismus produkující ethanol a snižují jeho výtěžky. [24, 25]

1.4.1 Amylolytické enzymy

Amylolytické enzymy reprezentují skupinu katalytických proteinů velkého významu pro potravinářský průmysl. Tyto enzymy jsou produkovány komerčně pomocí mikroorganismů. [26]

Amylasy tvoří třídu průmyslových enzymů, které zaujímají přibližně 25 % trhu s enzymy. Extracelulární amylázy, zejména amylasy štěpící surový škrob, nachází důležité uplatnění v biokonverzi škrobů a substrátů na bázi škrobu. Úroveň aktivity α -amylasy v různých lidských tělních tekutinách, je klinicky významný pro zkoumání např. diabetu, zánětu slinivky břišní a rakoviny, zatímco rostlinné a mikrobiální α -amylasy se používají jako průmyslové enzymy. [27]

Amylolytické enzymy rozkládající škrob mají velký význam v biotechnologických aplikacích od potravinářského, kvasného, textilního průmyslu po papírnický průmysl. Ačkoliv amylasy mohou být získány z různých zdrojů, jako jsou rostliny, živočichové a mikroorganismy, enzymy z mikrobiálních zdrojů obecně splňují průmyslové požadavky a významně přispívají k produkci potravin a nápojů v posledních třech desetiletích. Mikrobiální amylasy dnes téměř zcela nahrazují chemickou hydrolýzu škrobu ve škrobárenském průmyslu. [27]



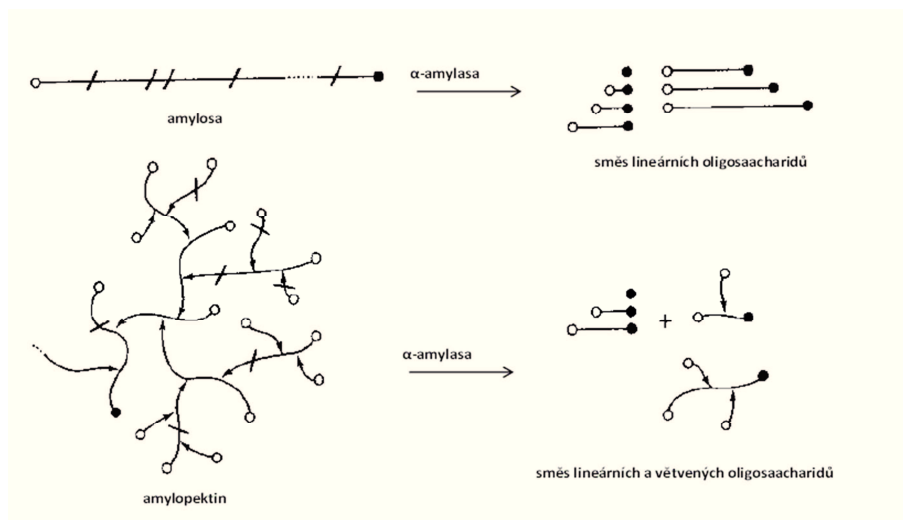
Obrázek 6 - Různé enzymy podílející se na degradaci škrobu (otevřený šestiuhelník symbolizuje redukující konec polyglukosové molekuly). [16]

1.4.2 α -amylasa

Jedná se o metaloenzym s vázaným vápenatým iontem, který je nutným kofaktorem pro enzymatickou aktivitu. K aktivaci je využíván také chloridový anion. Dokáže štěpit dlouhé řetězce polysacharidů na náhodných místech. Z amylosy vznikají maltotriosy a maltosy, štěpením amylopektinu maltosa, glukosa a limitní dextrin. [27]

Struktura a funkční charakteristiky

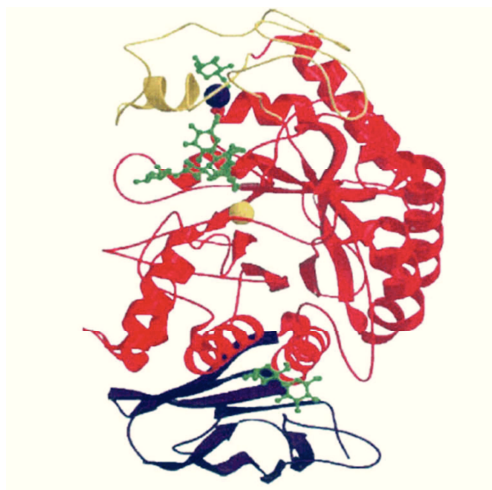
Endoamylasy, mezi které se α -amylasy řadí, katalyzují počáteční hydrolýzu škrobu na kratší oligosacharidy štěpením α -D-(1,4) glykosidických vazeb. Konce s glukosovými zbytky a α -(1,6) vazby však α -amylasa není schopna štěpit. Konečné produkty α -amylasy jsou oligosacharidy různé délky a limitní dextriny. Tyto dextriny jsou tvořeny směsí maltosy, maltotriosy a rozvětvenými oligosacharidy s 6 až 8 glukózovými jednotkami obsahující α -(1,4) a α -(1,6) vazby. Existují i další amylolytické enzymy účastnící se procesu štěpení škrobu, ale příspěvek α -amylasy je nejdůležitější pro zahájení tohoto procesu. [16, 28, 29, 30, 31, 32]



Obrázek 7 - Schématické znázornění působení α -amylasy na amylosu a amylopektin [33]

Amylase má trojrozměrnou strukturu schopnou vázat se na substrát a díky aktivitě vysoce specifické katalytické skupiny dochází k narušování glykosidických vazeb. Lidská α -amylasa je klasický enzym složený z 512 aminokyselin v jednom oligosacharidickém řetězci a vápenatým iontem uprostřed struktury. Molekulová hmotnost enzymu je 57,6 kDa. [29, 30, 34, 35]

Protein obsahuje 3 strukturní domény: A, B a C (viz obrázek 8). Doména A je největší a tvoří katalytické jádro enzymu. Doména B je nejmenší a je připojena k doméně A pomocí disulfidické vazby. Doména C má β strukturu (skládaného listu) připojenou k doméně A jednoduchým polypeptidovým řetězcem a jeví se jako nezávislá oblast s neznámou funkcí. Aktivní místo (vazebné místo substrátu) α -amylasy se nachází v dlouhé štěrbině mezi karboxylovými konci domén A a B. Oblast mezi doménami obsahuje i další důležitá místa, a to vazebná místa vápenatých a chloridových iontů. Vápenatý ion uvnitř struktury, krom funkce kofaktoru, může působit i při stabilizaci trojrozměrné struktury nebo jako allosterický aktivátor. Chloridové ionty jsou důležité z hlediska aktivace enzymu. [29, 30, 34, 35]



Obrázek 8 - Struktura α -amylasy: červeně - oblast A, žlutě - oblast B, fialově - oblast C, modrá koule vápenatý ion, žlutá koule - chloridový ion (oba ionty v katalytickém centru), zeleně - struktury vázané na aktivní místo a povrch vazebných míst. [34]

Zdroje α -amylasy

Zdroje α -amylasy mohou být rostliny, mikroorganismy a vyšší organismy, avšak z průmyslového hlediska jsou nejdůležitější mikroorganismy. U člověka se α -amylasa nachází ve slinách a slinivce břišní. Z mikroorganismů mohou být producenty plísně (*Ascomycetes* a *Basidiomycetes*) a bakterie (*Bacillus*). Z průmyslového hlediska je nejvýznamnější rod *Aspergillus* a *Bacillus*. Bakteriální amylasa je však preferovanější než plísňová, vzhledem k několika výhodám, které může nabídnout. Většinou se jedná o termostabilitu produkovaného enzymu. Bakterie rodu *Bacillus*, konkrétně *B. amyloliquefaciens* a *B. licheniformis* se využívají průmyslově nejvíce, jelikož jsou producenty termostabilních α -amylas. Termostabilní α -amylasy jsou žádanější, jelikož jejich použitím se minimalizuje riziko kontaminace a zkrátí se doba reakce, což přináší značnou úsporu energie. Hydrolýza prováděná za vysokých teplot také minimalizuje polymerizaci D-glukosy na isomaltosu. [36]

1.4.3 Glukoamylasa

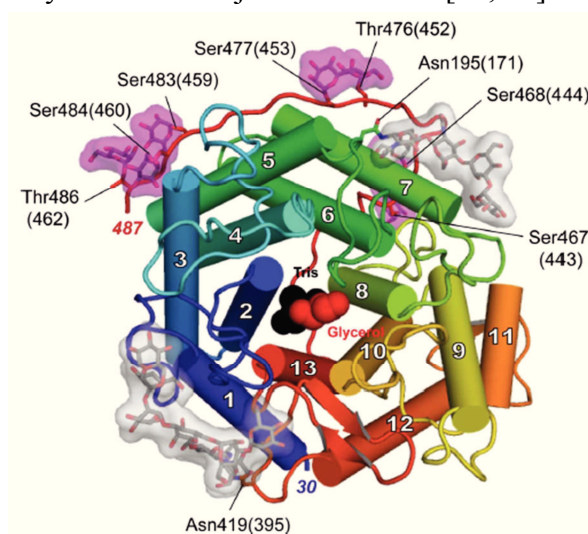
Glukoamylasa může být také nazývána amyloglukosidasa, glukogenní enzym, škrobová glukogenasa, γ -amylasa či exo-1,4- α -D-glukan glukanohydrolasa. Patří do skupiny exoamylas, které postupně hydrolyzují glukosové jednotky z neredukujících konců amylosy a amylopektinu. Na rozdíl od α -amylasy mnoho glukoamylas umí také hydrolyzovat α -(1,6) vazby ve větvicích místech amylopektinu, i když pomaleji, než α -(1,4) vazby. Tudíž výslednými produkty glukoamylasové aktivity jsou glukosa, maltosa a limitní dextriny. [36, 38]

Pro lihovarnický průmysl jsou obvykle využívány glukoamylasy získávané z *Aspergillus niger* nebo druhů rodu *Rhizopus*. Preferovanější je glukoamylasa z *Aspergillus niger*, vzhledem k vyšší odolnosti vůči vysokým teplotám (60 °C místo 55 °C). Avšak glukoamylasy produkované plísní *Aspergillus niger* se vyznačují také současnou transglykosidasovou aktivitou. Tato aktivita je nežádoucí, jelikož dochází k produkci nezkvasitelných oligosacharidů z maltosy, které obsahují α -(1,6) vazby, jako například isomaltosa, což vede ke snížení výtěžnosti glukosy. Byly však vyvinuty různé metody k odstranění transglykosidasové aktivity z amylolytických preparátů. Krom toho, jsou glukoamylasy schopny také katalyzovat reverzní hydrolýzu produkující hlavně maltosu a isomaltosu z glukosy. Do jaké míry tato reakce probíhá, záleží na koncentraci substrátu. [37]

Struktura a funkční charakteristiky glukoamylasy

Většina glukoamylas jsou enzymy s více oblastmi, tvořené katalytickou částí spojenou s koncem vázajícím se na škrob pomocí glykosilované spojovací oblasti. Konkrétně glukoamylasa GA-1 z *Aspergillus niger* se skládá ze tří oblastí: první obsahuje katalytické místo; druhá vysoce glykosilovaný spojovací segment a třetí oblast C-terminální je odpovědná za navázání škrobu a nepostradatelná pro aktivitu enzymu. Trojrozměrná struktura enzymu byla zjištěna z volných a inhibovaných komplexů glukoamylas získaných z *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* a *Saccharomycopsis fibuligera*. Katalytická oblast se sbaluje do tvaru stočeného válce s aktivním místem ve tvaru trychtíře, zatímco škrobové vazebné místo se stáčí do tvaru válce a má dvě vazebná místa pro škrob nebo cyklodextrin. [38, 39]

V kulturách plísní rodu *Aspergillus* byly objeveny dvě formy glukoamylas. Tyto dvě formy se významně liší molekulárními hmotnostmi, způsobem vazby a hydrolýzy škrobových zrn. Glukoamylasa 1 (GA-1) má 616 aminokyselinových zbytků a molekulární hmotnost 74 kDa. Tato forma glukoamylasy má schopnost vazby a hydrolýzy škrobových zrn. Glukoamylasa 2 (GA-2) je složena ze směsi peptidů obsahující 512 až 514 aminokyselinových zbytků. Její molekulární hmotnost je 62 kDa. Na rozdíl od GA-1, však nemá schopnost vazby a hydrolýzy škrobových zrn, jelikož jí chybí oblast vázající se na škrob. [38, 39]



Obrázek 9 - Struktura glukoamylasy: katalytická oblast - konec 30 (modrá) až 487 (červená), α -helixy (13) - válce číslovány od N-konce, Glykosylační místa manosy (magenta), NAG oligosacharidů (šedě), aktivní vazebné místo Tris (černá) a glycerol (červená). [38]

Zdroje glukoamylasy

Glukoamylasy mohou být získány z různých zdrojů, a to z rostlin, zvířat a mikroorganismů. Pro komerční využití jsou však nejvhodnější glukoamylasy mikrobiálního původu. Pro průmysl jsou pak nejvýznamnějšími producenty vláknité houby. [36]

1.4.4 Inhibitory amylas

Inhibitory amylas se dají rozdělit do dvou kategorií: (a) v přírodě se vyskytující proteiny, u kterých se předpokládá, že fungují jako obranný mechanismus proti predátorům jakými je třeba hmyz a (b) mono- nebo oligosacharidy, které mají strukturní vlastnosti takové, že se relativně silně vážou na aktivní místo enzymu. Rostlinné proteiny především inhibují α -amylasy. Pšenice produkuje inhibitor α -amylasy, který je znám již 50 let jako Kneenův inhibitor. Žito produkuje podobný α -amylasový inhibitor jako pšenice. Fazole a jiné luštěniny produkují α -amylasové inhibitory známe jako faseolamin a oves produkuje proteinový inhibitor, který inhibuje α - i β -amylasy. [23]

Dalším inhibitorem α -amylasy je askarbosa a u sladových α -amylas byla prokázána jako inhibitor kyselina askorbová. Mezi inhibitory lidské slinné a pankreatické α -amylasy patří 6-deoxymaltotetraosa a 6-deoxymaltopentaosa. Inhibitorem glukoamylasy je např.: dihydronojirimycin. [23]

1.5 Mikroorganismy produkující ethanol

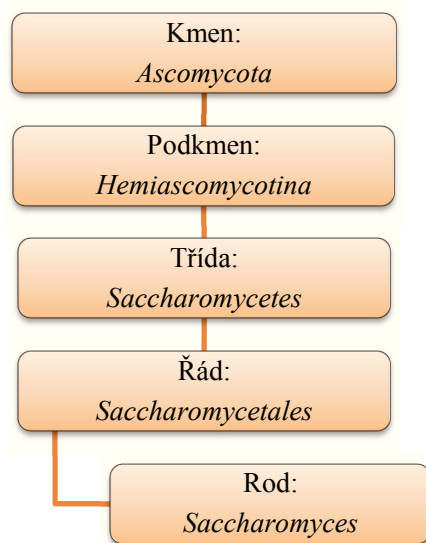
Schopnost zvýšené produkce ethanolu ze sacharidických substrátů má mnoho mikroorganismů. Hlavními producenty jsou však bakterie a kvasinky. Mezi bakteriální producenty ethanolu patří rody: *Zymomonas*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Thermoanaerobacterium*, *Zymobacter* a *Leuconostoc*. Z kvasinek a plísní mají tuto schopnost například rody: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Zyhosaccharomyces*, *Candida*, *Monacus*, *Zygoascus*, *Aureobasidium*, *Torulaspora*, *Chrysosporium*, *Pichia*. [40]

Hlavními producenty ethanolu jsou kvasinky, u kterých je základním požadavkem pro výběr vhodného kmene rychlost produkce ethanolu, vysoká tolerance vůči produktu, nízké nároky na růstové faktory, vysoká rezistence vůči kyselinám, inhibitorům, aj. Nejlépe tyto vlastnosti splňují kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a kmeny od nich odvozené, které jsou tradičně využívány v lihovarnickém průmyslu. Vyznačují se poměrně vysokou rychlostí tvorby a tolerancí ethanolu, další jejich výhodou je nízká tvorba jiných metabolitů. Za podmínek anaerobní fermentace se glukosa odbourá v glykolýze na pyruvát, který je následně dekarboxylován za vzniku acetaldehydu a ten se redukuje na ethanol. [24, 40, 41]

Mezi mikroorganismy produkujícími ethanol mohou být i bakterie, například *Zymomonas mobilis*. Na rozdíl od kvasinek mají rychlejší metabolismus, menší nároky na výživu a jsou více tolerantní vůči vyšším teplotám. Tyto bakterie využívají i jiné metabolické dráhy pro vznik ethanolu. Jedná se o tzv. Entner-Doudoroffovu dráhu, kde je klíčovým meziproduktem 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát (KDPG). Ačkoliv bakteriální producenty ethanolu nabízí mnoho výhod, pro průmyslovou praxi se u nás i ve světě stále používají kvasinky. [25, 40]

1.5.1 Rod *Saccharomyces*

Taxonomicky se řadí do kmene *Ascomycota*, ve kterém patří do podkmene *Hemiascomycotina*, třídy *Saccharomycetes* a řádu *Saccharomycetales*. Taxonomické zařazení je názorněji ukázáno na obrázku 12. [42]



Obrázek 10- Taxonomické zařazení rodu *Saccharomyces* [42]

Patří mezi nejznámější a nejprozkoumanější rod kvasinek. Název vychází z řeckých slov *sakcharon* = cukr a *mykés* = houba, což je v překladu doslovně „cukerná houba“. Buňky rodu *Saccharomyces* se vyznačují většinou tvarem elipsoidním, vejčitým nebo protáhlým. Hlavními složkami buněčné stěny jsou glukán a mannoproteiny. Vegetativní rozmnožování u nich probíhá multilaterálním pučením a vegetativní stádium je až na výjimky diploidní. Při pohlavním rozmnožování dochází také ke konjugaci mezi buňkami, kdy výsledkem je tvorba spor s hladkým povrchem v počtu 1 až 4 v jednom vřecku. Askospory obsahují chitosan a dityrosin. [43, 44]

Substrátem pro lihové kvašení kvasinek rodu *Saccharomyces* jsou většinou hexosy, které metabolizují pomocí tzv. glykolýzy neboli Embden-Meyerhofovy dráhy (EMP). Tato metabolická dráha se také nazývá hexosodifosfátová dráha. Optimální teplota pro kvašení se pohybuje mezi 22 až 25 °C. Druhy pro pivovarské spodní kvašení se adaptovaly na teploty 5 až 12 °C, jelikož tento typ kvašení probíhá za nízkých teplot. [40, 43]

Saccharomyces cerevisiae

Patří mezi nejdůležitější druh rodu *Saccharomyces*, vzhledem k výrazným fermentačním schopnostem se uplatňuje jako pekařská, lihovarská, vinařská nebo spodní či svrchní pivovarská kvasinka. Druhový název pochází z latinského *cerevisiae*, znamenající pivo. Slouží jako modelový mikroorganismus pro biochemické a genetické práce, z toho důvodu je nejprostudovanější kvasinkou. [43]

Druh *Saccharomyces cerevisiae* má tvar buněk elipsoidní až kulovitý. Velikost buněk je na délku asi 3,7 až 9,7 μm a na šířku asi 2,6 až 6,4 μm . Má schopnost vytvářet rudimentární nebo stroměčkovité, bohatě větvené pseudomycelium. Jednotlivé články mycelia mohou být i delší jak 30 μm , avšak pravé hýfy nevytváří. Na agaru vyrůstají ve formě bělavě krémových, vyvýšených, hladkých, lesklých kolonií s kruhovitým nevláknitým okrajem. Ze sacharidů mají schopnost zkvašovat glukosu, galaktosu, sacharosu, maltosu a rafinosu, tu však lihovarské kmeny zkvašují pouze z jedné třetiny tak, že se odštěpuje pouze fruktosa a následně se v médiu hromadí disacharid melibiosa. Neasimilují však dusičnanový dusík a laktosu. [40, 43]

Během odbourávání glukosy se můžeme u *S. cerevisiae* setkat s několika regulačními mechanismy. Prvním z nich je tzv. Pasteurův efekt, který se projevuje za aerobních podmínek, když je koncentrace substrátu v médiu nižší než $5 \cdot 10^{-3}$ M a buňka odbourává glukosu pomaleji než za anaerobních podmínek. Tento jev je důsledkem základních regulačních mechanismů týkajících se různých klíčových enzymů přítomných v metabolismu glukosy. Anaerobní dehydrogenační procesy přejdou na aerobní proces, který je provázen zvýšenou tvorbou biomasy a současně dochází k snížení spotřeby substrátu. Zároveň dochází k zastavení tvorby produktů fermentace, protože substrát je oxidován až na oxid uhličitý a vodu. Pasteurův efekt je významný v biotechnologii při produkci biomasy. [40, 45]

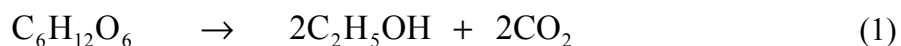
Dalším významným efektem je tzv. Crabtree efekt, kdy při koncentraci glukosy vyšší než $5 \cdot 10^{-3}$ M a aerobních podmínek je respirace potlačena a začne probíhat fermentace. Zde se předpokládá, že glukosa inhibuje syntézu enzymů dýchacího řetězce nebo je inaktivuje i včetně transportu sacharidu do buňky. Tento jev způsobuje komplikace u kontinuálních fermentací při změně zředovací rychlosti z nižší na vyšší. Za nižší zředovací rychlosti je metabolismus oxidační (zvětšuje se biomasa) a při vyšších zředovací rychlosti je fermentační, dochází tedy k tvorbě ethanolu. [40, 43, 45]

U *S. cerevisiae* se uplatňuje i katabolická represe, kdy glukosa či jiný produkt glukosového metabolismu inhibuje syntézu různých enzymů dýchacího řetězce a glukoneogeneze. Tento jev u *S. cerevisiae* způsobuje dlouhodobou adaptaci na degradaci glukosy výhradně na ethanol a oxid uhličitý. Ve vzdušněné vsádkové kultuře mohou být buňky po utilizaci glukosy deprimované a dochází k indukci enzymů dýchacího řetězce. Buňka přejde do tzv. diauxie (pozn. postupné využívání dvou substrátů). V důsledku toho dochází k reutilizaci vytvořeného ethanolu a snížení jeho obsahu v médiu. [40, 43]

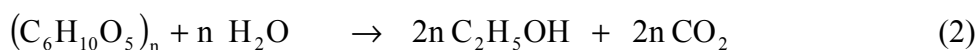
Krom katabolické represe se u *S. cerevisiae* vyskytuje i katabolická inaktivace, která probíhá rychleji než represe. Pravděpodobně k ní dochází deaktivací některých klíčových enzymů např. fruktosa-1,6-bisfosfát, kterou indukuje glukosa. Dalším možný jevem je limitovaná oxidace, kdy buňka roste na sacharidickém substrátu a pyruvát je v nadbytku. Za přítomnosti kyslíku je proto metabolismus kvasinek respiračně-fermentativní. [40]

1.6 Lihové kvašení

Lihové kvašení je proces výroby ethanolu založený na rozkladu sacharidů působením enzymů mikrobiální buňky (většinou se jedná o buňky kvasinek). Tento proces převážně probíhá anaerobně, tedy bez přístupu vzduchu. U kvasinek se však nemusí jednat o striktně anaerobní podmínky. Může být žádané mírné provzdušnění média na počátku fermentace, aby buňky mikroorganismu mírně narostly a zvýšila se jejich aktivita. Rozklad sacharidů je doprovázen uvolňováním energie. Tato energie je z části fixována ve formě ATP a zbytek je přeměněn na teplo. Lihová fermentace lze popsat Guy-Lussacovou rovnicí [24, 25]:



Tato rovnice je i sumárním vyjádřením Embden-Meyerhofovy dráhy (EMP) a vychází z ní, že ze 100 % hm. glukosy vznikne 51,14 % hm. ethanolu a 48,6 % hm. oxidu uhličitého. Guy-Lussacova rovnice lze upravit i pro stanovení teoretického výtěžku ethanolu z jiných sacharidů. Pro fermentaci zcukřených škrobnatých zápar se uvažuje následující rovnice:



Podle ní lze určit teoretická výtěžnost ethanolu ze škrobu na 56,83 % hm.. Praktická výtěžnost ethanolu se však liší, jelikož dochází ke ztrátám zkvašovaného cukru na růst kvasinek a na tvorbu dalších metabolitů. Kromě ethanolu a oxidu uhličitého vzniká i 6 % vedlejších produktů, kterými jsou vyšší alifatické uhlovodíky, které se nazývají přiboudlina. Zde patří například glycerol, 2,3butylenglykol, acetoin, acetaldehyd, kyseliny mravenčí, octová, mléčná. Přiboudlina vzniká i důsledkem růstu kvasinek, které tvoří i sekundární metabolity. Množství a vznik těchto látek jsou závislé na okolních podmínkách (např.: teplota, množství dusíkatých látek) a charakteristice vybraného druhu kvasinek. [25, 46]

Nejvýznamnějšími vedlejšími produkty lihového kvašení jsou glycerol a některé organické kyseliny a jejich estery. Tyto vedlejší produkty při výrobě lihu jsou většinou nežádoucí a snažíme se zabránit jejich vzniku. Tvorbu glycerolu lze ovlivnit podmínkami fermentace, jako hodnota pH, obsah siřičitanu, výběrem kvasinkové kultury. Organické kyseliny většinou vznikají přítomností kyslíku v médiu. [25]

1.7 Bioinženýrské charakteristiky

1.7.1 Techniky kultivace mikroorganismů

Mikroorganismy lze kultivovat dvěma různými způsoby, a to povrchovou (emersní) nebo hloubkovou (submersní) technikou. [46]

Povrchová technika, jak již název napovídá, probíhá na povrchu kapalného nebo pevného média, a je poměrně komplikovaná. Tato metoda pro to není příliš vhodná pro průmyslové využití. U submerzní techniky rostou mikroorganismy v kapalném médiu. Touto technikou se provádí významné velkoobjemové procesy výrob, fermentací a zpracování odpadů. [46]

Submerzní technika může být prováděna diskontinuálně (staticky, vsádkovým způsobem), nebo kontinuálně. U vsádkového (diskontinuálního) způsobu se naplní bioreaktor a zaočkuje inokulem, dochází k množení buněk a postupnému spotřebovávání živin. Podmínky kultivace se mění s časem. Po určité době se bioreaktor vypustí a jeho obsah je dále zpracován. Kdežto při kontinuální kultivaci jsou mikroorganismy a nové médium plynule doplňovány a staré médium se suspendovanými mikroorganismy je odstraňováno odtokem. Jedná se tedy o otevřený systém směřující k ustálenému stavu. K stabilizaci systému přispívá stabilizace jednoho růstového substrátu. Růst buněk probíhá za konstantních okolních podmínek. Výhodou kontinuální kultivace je možnost její automatizace. [46]

Diskontinuální, neboli vsádková kultivace se používá v praxi při výrobě antibiotik a dalších sekundárních metabolitů či aminokyselin. Kontinuální kultivace je vhodná při produkci biomasy (např. výroba krmné biomasy a pekařského droždí) nebo metabolitů tvořících se plynule během růstu buněk (fermentační produkty). Lze ji však využít i pro produkci sekundárních metabolitů, a to například vytvořením série bioreaktorů, aby bylo dosaženo požadovaného fyziologického stavu buněk. [46]

1.7.2 Růstová křivka mikroorganismů

Ve stacionární kultuře lze stanovit jednotlivé fáze růstu mikroorganismu, které vynášíme do tzv. růstové křivky. Tu můžeme definovat jako grafické znázornění vzrůstu počtu živých buněk a je vyjádřením časové změny koncentrace mikroorganismů. [43, 46]

Fyziologické vlastnosti buněk, nacházejících se v různých fázích růstových křivek, se značně liší. Například buňky ve stacionární fázi a na počátku lag-fáze jsou méně citlivé vůči nepříznivým podmínkám (vysoká teplota, osmotický tlak, atd.), než buňky nacházející se v pozdní lag-fázi a ve fázích růstu. [43]

Růstová křivka má následující úseky:

Lag fáze (přípravná, adaptační):

V této fázi se buňky nerozmnožují, zvětšují objem a dochází k aktivaci enzymatického systému buněk. Délka fáze se liší podle fyziologického stavu buněk, druhu mikroorganismu, velikosti inokula a složení substrátu. [43, 47]

Fáze zrychleného růstu (akcelerační):

Kultura je již přizpůsobena podmínkám prostředí, růst buněk se postupně zrychluje, začínají se množit. Jedná se o přechodnou fázi. [43, 47]

Fáze exponenciální (logaritmická):

Je charakterizována nejkratší generační dobou buněk, konstantní během celé této fáze, a intenzivním množením buněk. V této fázi dochází k rychlému vyčerpávání substrátu, avšak nedochází ještě k limitaci živinami. Limitující však mohou být vlastnosti kultury, charakter prostředí a teplota kultivace. Tato fáze je nejdůležitější z důvodu tvorby primárních metabolitů (např. kyselina mléčná, ethanol). Po přenesení buněk v této fázi do nového kultivačního média o stejném složení pokračují buňky v rozmnožování se stejnou generační dobou, tedy bez zřetelné lag-fáze. Tato fáze se také často označuje jako logaritmická vzhledem k lineární závislosti mezi logaritmem počtu buněk a dobou růstu. [43, 45, 47]

Rychlost růstu buněk mikroorganismu je v kterémkoliv okamžiku exponenciální fáze úměrná počtu buněk v tomto okamžiku a lze vyjádřit vztahem:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (3)$$

kde μ je měrná růstová rychlost [h^{-1}], X je koncentrace biomasy [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$] a t je čas [h]. [43, 47]

Fáze zpomaleného růstu (deklinace):

Dochází ke zpomalování rychlosti množení, celkového metabolismu a roste počet odumírajících buněk. Postupně se vyčerpávají živiny a hromadí se metabolity. Vlivem toho se mění například pH a redoxní potenciál, což má nepříznivý vliv na růst. [43, 47]

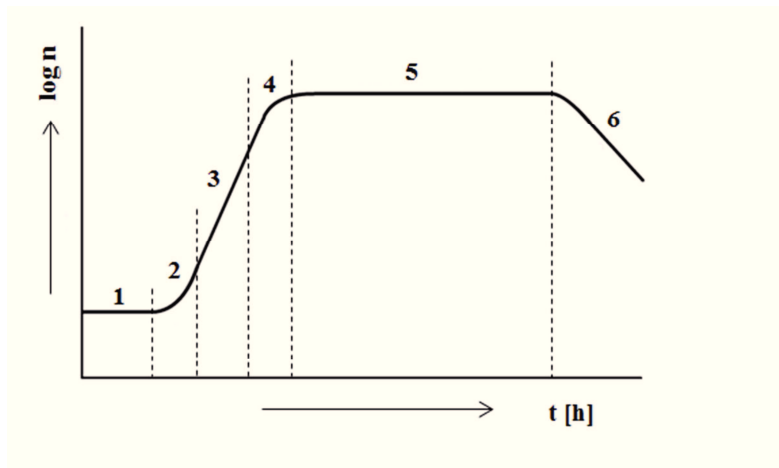
Fáze stacionární:

V této fázi se zastavuje přírůstek živých buněk, to může být způsobeno vyčerpáním živin nebo vzrůstem koncentrace toxického metabolitu nad určitou hranici. Počet odumírajících buněk je vyrovnáván velmi pomalým rozmnožováním, což udržuje konstantní počet buněk. Délka stacionární fáze se liší podle druhu mikroorganismů a je závislá na citlivosti daného mikroorganismu vůči stresovým podmínkám (hladovění, přítomnost toxického metabolismu aj.). Během této fáze dochází k tvorbě endospor u sporulujících mikroorganismů. Tato fáze je nejdůležitější pro tvorbu sekundárních metabolitů (např. antibiotika, aj.). [43, 47]

Fáze zrychleného odumírání:

Buňky se již nerozmnožují, klesá koncentrace živých buněk. Klesá i koncentrace živin pod kritickou hladinu, čímž se snižuje aktivita metabolismu. U některých mikroorganismů může tato fáze trvat týdny i měsíce. [43, 46]

Grafické znázornění vzrůstu počtu živých buněk se provede tak, že na osu x je nanesen čas [h] a na osu y je nanesen logaritmus počtu živých v 1 litru (viz Obrázek 11). [43]



Obrázek 11 - Růstová křivka [48]

t – doba [h], n – počet živých buněk v 1 ml, 1 – Lag fáze, 2 – fáze zrychlujícího se růstu, 3 – exponenciální fáze růstu, 4 – fáze zpomalujícího se růstu, 5 – stacionární fáze růstu, 6 – fáze odumírání

1.8 Bioethanol

Bioethanol je ethanol produkován fermentační technologií nazývanou lihové kvašení z biomasy, který je následně používán jako biopalivo. Nejčastěji používanou biomasou jsou rostliny obsahující vyšší množství škrobu a sacharidů. Rostliny obsahující pouze šestiuhlíkaté monosacharidy se fermentují přímo. Polysacharidy a oligosacharidy v surovině musí být před fermentací upraveny tak, aby se rozložily na monosacharidy, tento proces se nazývá hydrolýza. Hydrolýza může být enzymatická, alkalická či kyselá, podle druhu substrátu. Ne vždy je nutné k surovině přidat komerční enzym, některé mikroorganismy mají enzymatické vybavení a jsou schopny substrát hydrolyzovat. V poslední době se zvyšuje počet mikroorganismů schopných hydrolýzy vyšších sacharidů díky technikám genového inženýrství. Podle druhu biomasy na výrobu bioethanolu, se může výroba rozdělit do tří skupin:

- výroba z biomasy obsahující jednoduché cukry (např.: cukrová řepa, cukrová třtina),
- výroba z biomasy obsahující škrob (např.: obiloviny, brambory, topinambury),
- výroby z lignocelulosoové biomasy (např.: sláma, rychle rostoucí dřeviny, štěpky, odpadní papír). [49, 50]

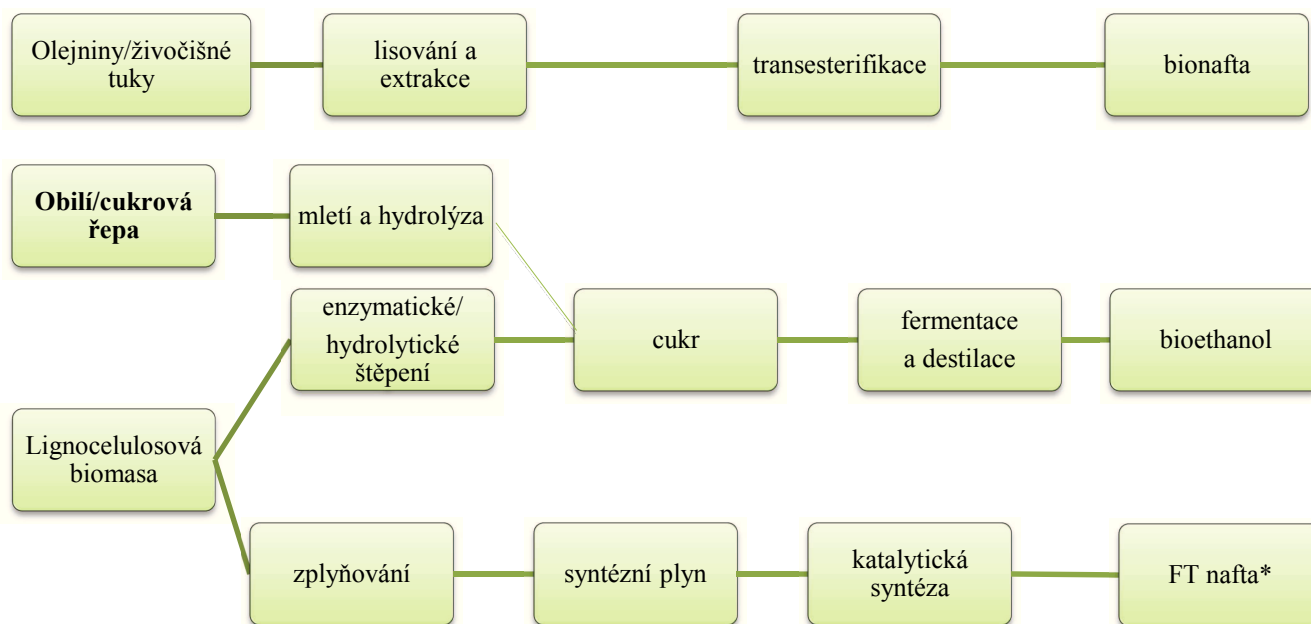
Použití bioethanolu je především ve spalovacích motorech jako pohonná hmota. Vzhledem k vlastnostem ethanolu se v praxi nepoužívá čistý, ale pouze jako přísada do konvenčních minerálních paliv v množství 5 až 10 %. Nízký přírůstek bioethanolu do paliva nemění výrazně jeho vlastnosti a není potřeba proto upravovat spalovací motory automobilů. Přírůstek ethanolu do paliva zvyšuje oktanové číslo a snižuje množství emisí CO_2 . [49, 50]

1.8.1 Biopaliva

Biopaliva jsou získávána z obnovitelných zdrojů energie a jsou šetrná k životnímu prostředí. Biopaliva, jako bioethanol, se získávají z potravinářských plodin, biomasy nebo lignocelulosoových materiálů prostřednictvím biochemických a termochemických procesů. Lignocelulosoové materiály jsou materiály na bázi celulosy a patří zde zemědělské odpady, dřevo a dřevní štěpky, piliny, odpadní papír, energetické plodiny a jiné odpadní suroviny. Technologie výroby biopaliv se může rozdělovat na technologii první a druhé generace. [51]

Technologie první generace, zde patří například kukuřičný ethanol a bionafta. Tato technologie vyrábí biopaliva převážně z potravinových plodin, u bioethanolu tj. přímo z cukrové třtiny, cukrové řepy nebo nepřímo předupravením škrobu z kukuřice, obilí, brambor. Po zkvašení těchto surovin následuje destilace. Nevýhodou první generace je konkurence s výrobou potravinářských plodin a krmiv, proto se od této technologie začíná ustupovat. [51, 52, 53]

Technologie druhé generace vyrábí biopaliva z nepotravinových plodin, případně z nepoživatelných částí potravinářských plodin obsahujících těžko štěpitelnou celulosu. Do této kategorie spadá bioethanol vyráběný z lignocelulosoové biomasy (dřevo, těžební zbytky, seno, sláma, rostlinné odpady, rychle rostoucí dřeviny, atd.). Biopaliva druhé generace jsou výhodnější z hlediska ekologické zátěže, nabízí až 90% potenciál snížení emisí CO_2 ve srovnání s fosilními palivy. Existují i biopaliva třetí generace, avšak zde už se nejedná o bioethanol, nýbrž o výrobu bionafty a biobutanolu z mořských řas. [51, 52, 53, 54]



Obrázek 12 - Technologické postupy výroby biopaliv 1. a 2. generace,

*syntetická motorová nafta vyrobená Fischerovou-Topischovou syntézou [53]

1.8.2 Výroba ethanolu ze škrobnatých surovin

Škrob je substrát, který musí být před fermentací převeden na jednoduché sacharidy (glukosa, maltosa), jelikož většina mikroorganismů produkujících ethanol není schopna jej přímo fermentovat. Technologie zpracování škrobnatých surovin prochází značnými změnami. Ty jsou hlavně v oblasti snížení energetických nákladů na výrobu použitím vysoce aktivních enzymových preparátů na hydrolyzu škrobu. [24]

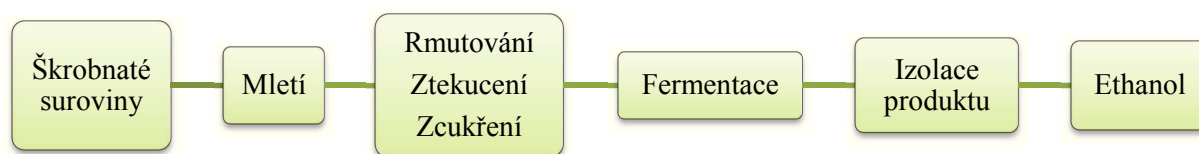
Při zpracování škrobnatých surovin je důležitý krok jejich mechanické rozmělnění, kterým dochází k zpřístupnění škrobových zrn amylolytickým enzymům. V dnešní době se upřednostňují pro hydrolyzu enzymové preparáty před použitím speciálního sladu, který se vyznačoval vysokou aktivitou. Jako první se při enzymatické hydrolyze aplikuje α -amylasa na ztekucení škrobu a následně se přidá glukoamylasa či β -amylasa na zcukření substrátu. Je možno použít i kyselou hydrolyzu. Nicméně během kyselé hydrolyzy vznikají vedlejší produkty (např.: 5-oxy-2-furan-karbaldehyd, kyselina levulová, kyselina mravenčí, aj.) s inhibičními účinky, čímž se snižují výtěžky ethanolu. [24, 25]

Rozlišujeme dva základní způsoby přípravy zápar (substrát pro fermentaci), a to tlakový (pařákový) a beztlakový. V poslední době se díky výrobě termostabilních bakteriálních α -amylas používá častěji beztlakový způsob.[24]

Tlakový způsob využívá teploty vyšší než 120 °C a tlak 0,2 až 0,5 MPa (podle suroviny) k uvolnění a zmazování škrobu. Tento způsob probíhá v tzv. pařáku. Nejpoužívanější pařák se nazývá Hanzeův a jeho objem se pohybuje mezi 4,5 a 6,5 m³. Výhoda této metody je, že dojde k sterilizaci díla, avšak nevýhodou jsou vyšší náklady za energii. Po paření se vyhání dílo do zapařovací kádě a zároveň se chladí. Po zchlazení se přidávají ztekucující enzymy. [24]

Beztlakový způsob obnáší rozmělnění či rozemletí škrobnaté suroviny na malé částice (asi 0,4 až 2,0 mm). Obilí se mele za sucha nebo za mokra, přičemž mokré mletí je výhodnější z důvodu bobtnání škrobových zrn. Dalším krokem je vyhřátí díla na teplotu 65 °C nebo vyšší, podle vlastností α -amylasy. Dochází k zmazování a ztekucení škrobu.[24]

Po té se dílo ochladí v zapařovací kádi na 55 až 65 °C a nechá se zcukřit pomocí β amylasy či amyloglukosidasy. Množství zkvasitelných cukrů se následně zjistí pomocí jodové zkoušky. V praxi jsou využívány enzymové preparáty s enzymatickými komplexy, kde kromě amylolytických enzymů jsou i další hydrolytické enzymy, např. hemicelulasy, proteasy a celulasy. Tyto enzymy zvyšují výtěžnost lihu a zároveň snižují viskozitu média. Firma Novozymes dodává pro lihovarské účely amylolytické enzymy pod názvy: Termamyl, BAN, AMG, Fungamyl, SAN Super. Pro zvýšení výtěžků lihu a vlastností zápar dále nabízí preparáty Ultraflo, Celluclast a Shearzyme. [24, 41]



Obrázek 13 - Obecné schéma výroby ethanolu ze škrobnatých surovin [55]

Jakmile je dílo zcukřeno, ochladí se na zákvasnou teplotu a zakvasí se kvasinkami. Ty mohou být různého původu. Nejvhodnější jsou z čistých lihovarských kultur, které jsou již adaptovány na škrobnaté zápary. Může být použito i lisované pekařské droždí, které je vhodné před použitím rozkvasit v sladké zápaře, ale není vhodné jej použít přímo, jelikož se vyrábí aerobně. Existují i sušené aktivní lihovarské kvasinky. Škrobnaté zápary z obilí a brambor již nemusí být přiživovány, jelikož obsahují dostatek živin pro růst kvasinek. Vhodné pH pro fermentaci se pohybuje mezi 4,6 až 4,8 a nemělo by klesnout pod 4,2. Během fermentace ještě dochází k dalšímu štěpení škrobu amylolytickými enzymy. [24]

V malých lihovarech využívá pro fermentaci periodický (vsádkový) způsob. Doba kvašení se pohybuje okolo 48 až 72 hodin, v závislosti na činnosti enzymů a kvasinek. Výsledná koncentrace ethanolu se pohybuje okolo 7 až 8 % obj..[24]

Prokvašené zápary se v malých lihovarech destilují na záparové koloně. Výsledný surový líh má koncentraci většinou 82 až 92 % obj. U dvoukolonového uspořádání slouží první kolona k oddestilování ethanolu ze zápary a druhá pro zesílení lihových par. Surový líh je dále rafinován a rektifikován, a to buď přímo v malých lihovarech či dodán do průmyslových lihovarů k zpracování na rafinovaný líh. [24]

1.9 Analytické metody

1.9.1 Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi-Nelsona

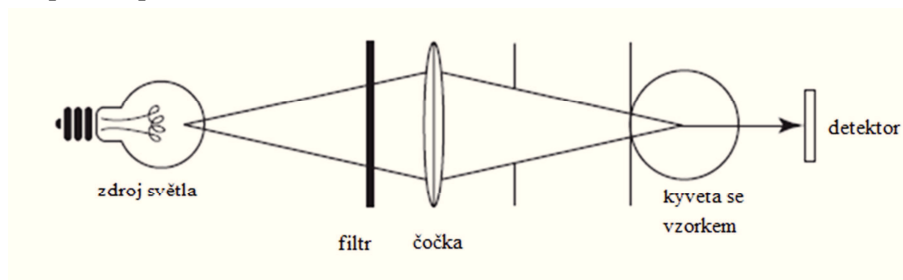
Metoda je založena na redukci měďnatých iontů (Cu^{2+}) na měďné (Cu^+) pomocí redukujících sacharidů. Tyto ionty jsou obsaženy v tzv. Somogyiho činidle a reakce probíhá v alkalickém prostředí za zvýšení teploty (100 °C). Měďné ionty následně redukují arsenomolybdenanový komplex, který se připravuje smícháním molybdenanu amonného $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$ a hydrogenarseničnanu sodného (Na_2HAsO_7) za přítomnosti kyseliny sírové a vody. Tento komplex je nazýván Nelsonovým činidlem. Redukcí Nelsonova činidla vzniká

modrozelený komplex, jehož koncentrace se určí z měření absorpance při 540 nm proti slepému vzorku. [56, 57]

Tato reakce není stechiometrická a musí být proto stanovena kalibrační křivka sacharidů, které jsou stanovovány nebo D-glukosy. Množství redukujících cukrů je dále spočteno na základě kalibrační křivky. Za standardních podmínek je přesnost Somogyi-Nelsonovy metody $\pm 0,01$ mg pro D-glukosu, D-galaktosu a maltosu. Nejpřesnějších výsledků je dosaženo, pokud se tato metoda provádí v inertní atmosféře a pokud měřená koncentrace nepřesahuje $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Pokud není k dispozici spektrofotometr, je možno tuto metodu provádět kvalitativně. [56, 57, 58]

1.9.2 Turbidimetrie

Zákal neboli turbidita média je výrazem jeho optické vlastnosti, která je způsobena rozptýlením nebo vstřebáním světla procházejícího přímo skrz něj. Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO) definuje turbiditu jako: „snížení průhlednosti kapaliny způsobenou přítomností nerozpustných látek“. Médium je obvykle tekutina (ale může být i pevná látka), ve které je světlo rozptýleno malými částicemi a přerušena jeho světelná dráha. Měření turbidity se používá v mnoha analytických oblastech k určení hmotnostní koncentrace suspendovaných částic ve vzorku a v některých případech lze použít i k měření rozdělení velikosti částic. [59, 61]



Obrázek 14 - Schéma měření turbidity vzorku [59]

Přímý vztah mezi turbiditou a koncentrací rozptýlených částic je zeslaben složitou interakcí energie světla s rozptýlenými částicemi. Tento vztah je silně závislý na mnoha faktorech:

- koncentrace rozptýlených částic v médiu;
- velikostní rozdělení rozptýlených částic;
- tvar, orientace a povrch rozptýlených částic;
- index lomu rozptýlených částic;
- index lomu suspenzního média;
- vlnová délka použitého světelného zdroje. [59]

Nejvhodnější vlnové délky používané pro praxi jsou od 340 do 450 nm. Menší vlnové délky bývají v biologických vzorcích pohlcovány bílkoviny. Závislost intenzity prošlého záření a absorpčních vlastností prostředí je exponenciální. Tato závislost je vyjádřena vztahem:

$$I_t = I_0 \cdot e^{-\tau \cdot l} \quad (4)$$

kde I_t = intenzita prošlého záření, I_0 = intenzita světelného zdroje, τ = turbiditní koeficient, l = světelná dráha kyvetou. [60]

Tato poměrně rychlá a účinná metoda je také využívána pro odhad počtu buněk v tekutém médiu při stanovení velkého počtu kultur najednou. Turbidimetrická měření používají pro kvantifikaci zeslabení záření rozptýleného na velkých částicích veličinu, která se nazývá optická hustota (OD = optical density). Optická hustota se může přepočítat na množství buněk. Jako slepý vzorek k nastavení 100% transmitance se používá čisté nezaočkované médium. Podle barvy roztoku, resp. média se mohou měnit vlnové délky, a to 420 nm pro čiré roztoky, 540 nm pro světle žluté a 600 až 625 nm pro žluté a hnědé roztoky. [56, 60]

1.9.3 HPLC

HPLC je zkratkou anglického high performance liquid chromatography, což v překladu znamená vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Tato chromatografická technika slouží k separaci složek vzorku za účelem stanovení přítomnosti a koncentrace daných složek ve vzorku. Může sloužit také k izolaci jednotlivých složek, což se nazývá preparativní chromatografie. Aparatura HPLC se liší od běžné sloupcové zejména přítomností vysokotlakého čerpadla umožňujícího průtok mobilní fáze kolonou o menších rozměrech. V koloně je vázána stacionární fáze na částice s velikostí několik mikrometrů. Dané uspořádání je příčinou vyšší účinnosti separace látek za kratší dobu, oproti klasické sloupcové chromatografii. [62, 63]

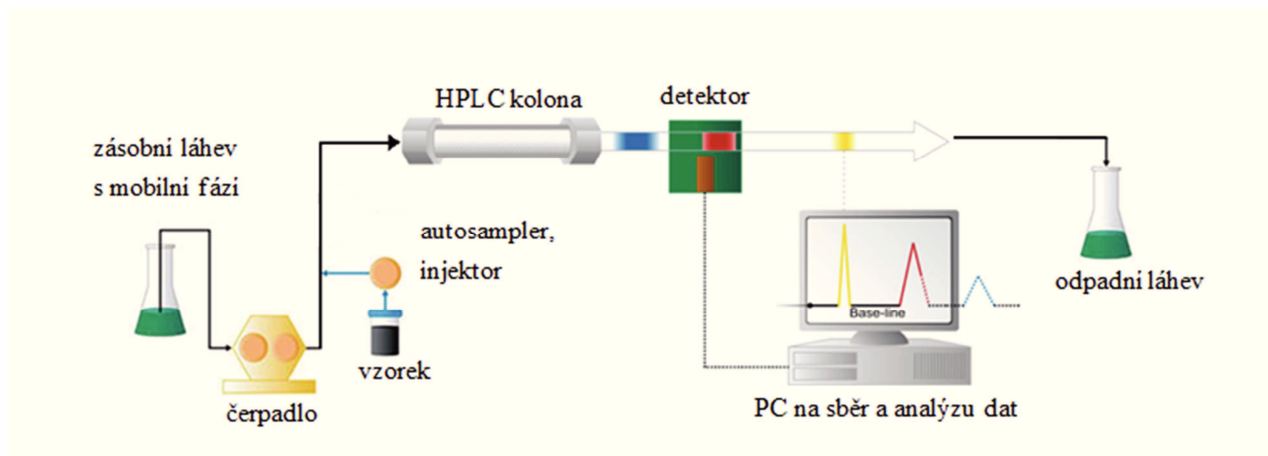
S rostoucím povrchem polárního adsorbentu, bazicitou funkčních skupin a polaritou separovaných sloučenin, roste i retence sloučenin. Retence látek na polárních adsorbentech roste v pořadí funkčních skupin od alifatických uhlovodíků po sulfokyseliny. Retence klesá s rostoucí polaritou mobilní fáze. Polarita a zároveň eluční síla mobilní fáze od n-heptanu po vodu (viz tabulka). Uspořádání chromatografického systému s polární stacionární fází a méně polární mobilní fází se nazývá z historických důvodů jako systém s normálními fázemi (NP-HPLC). Praktické použití tohoto uspořádání kapalinové chromatografie ustoupilo ve prospěch uspořádání s obrácenými fázemi (RP-HPLC). [62]

Tabulka 1 - Eluotropní řada [62]

Nepolární (lipoofilní) rozpouštědla	n-hexan	1-butanol	Polární (hydrofilní) rozpouštědla
	Cyklohexan	Pyridin	
	Chlorid uhličitý	Aceton	
	Benzen	Propanol	
	Dichlormetan	Metanol	
	Chlodoform	Formamid	
	Dietyléter	Voda	

HPLC přístroje se skládají z nádržky s mobilní fází, čerpadla, injektoru, separační kolony a detektoru. Sloučeniny jsou oddělovány tak, že vzorek je pomocí injektoru vnesen do kolony. Různé složky směsi prochází kolonou různou rychlostí důsledkem odlišné rozdělovací schopnosti mezi kapalnou mobilní fází a stacionární. [62, 63]

Použitá rozpouštědla musí být odplyněna kvůli eliminaci vzniku bublin. Čerpadla by měla zajistit vysoký tlak a konstantní průtok bez pulzů. Mohou být naprogramována tak, aby se měnilo složení rozpouštědla během separace. Kapalný vzorek se zavádí do dávkovací smyčky vstříknutím pomocí injektoru. Po naplnění smyčky se vzorek vnese do blízkosti počátku chromatografického lože vřazením dávkovací smyčky do proudu mobilní fáze. Přítomnost analytů protékajících kolonou je zaznamenávána různými způsoby detekce, a to změnou indexu lomu, UV-VIS absorpce s měnitelnou vlnovou délkou, fluorescence po excitaci vhodnou vlnovou délkou nebo elektrochemickou reakcí. K detekci může být také použita hmotnostní spektrometrie, která může poskytovat krom detekce separovaných látek i informaci o struktuře oddělených analytů a jejich identifikaci. [62, 63]



Obrázek 15 - Schématické znázornění HPLC přístroje [64]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části této diplomové práce byla optimalizace enzymatické hydrolýzy tak, aby škroby obsažené v odpadním chlebu byly co nejvíce rozštěpeny na jednoduché sacharidy. Produkty hydrolýzy byly dále použity na fermentaci a její optimalizaci k získání co největšího množství ethanolu pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

Jako inspirace pro plánování postupu hydrolýzy bylo čerpáno z článku *Ethanol production from bread residues* a pro fermentaci z článku *Effect of Physical Parameters on Second Generation Bio-Ethanol Production from Oil Palm Frond by Saccharomyces cerevisiae*. [65, 66]

2.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

2.1.1 Enzymy pro hydrolýzu odpadního chleba

***α*-amylasa z *Bacillus amyloliquefaciens* - Sigma Aldrich A7595 (Novozymes BANTM 240)**

Jedná se o endoamylasu náhodně hydrolyzující α -(1,4) glukonové vazby v amylase a amylopektinu. Produkty působení tohoto enzymu jsou oligosacharidy a dextriny o různých délkách řetězce. Tento enzym pracuje nejlépe za vysokých teplot, v rozpětí 70 až 90 °C, což je výhodou pro průmyslové využití, jelikož je omezeno riziko kontaminace. Tento enzym se využívá především pro ztekucení substrátu a tvorbu redukcujících cukrů. [67]

Tabulka 2 - Enzymová aktivita preparátu BAN 240L, doporučené pH, teplota a dávkování [41]

Enzym	Teplota [°C]	pH	Rozsah dávkování (na tunu škrobu)	Deklarovaná aktivita
BAN 240 L	70 - 80	6 - 6,5	200 - 500 g	240 KNU/g ¹

¹ KNU = Kilo Novo Units α -amylase (množství enzymu, které rozštěpí 5,36 g škrobu za hodinu při Novozymes standardizovaných podmínkách pro stanovení alfa-amylasy) [68]

Tabulka 3 - Teplotní a pH optimum preparátu BAN 240L [41]

Enzym	pH 5,0	pH 5,3	pH 5,6	pH > 6
BAN 240 L	60°C	65°C	70°C	75°C

***Glukoamylasa z Aspergillus niger* - Sigma Aldrich A7095 (Novozymes AMG 300LTM)**

Glukoamylasa z *A. niger* je schopna hydrolyzovat α -D-(1,4), α -D-(1,6), a α -D-(1,3) glykosidické vazby oligosacharidů. Jedná se o extracelulární enzym, který přeměňuje škrob na dextriny a glukosu. Tento typ enzymu nachází uplatnění v pivovarnictví a ve výrobě chleba a ovocných šťáv, dále pak v škrobovém průmyslu pro komerční výrobu D-glukosy z kukuřičných sirupů. Tento enzym je vhodné použít k sacharifikaci po předešlém ztekucení α -amylasou. [69]

Tabulka 4 - Doporučené pH, teplota a dávkování enzymového preparátu AMG 300L [70]

Enzym	Teplota [°C]	pH	Rozsah dávkování (na tunu škrobu)	Deklarovaná aktivita
AMG 300 L	60	4,5	1,0 - 1,2 l	300 AGU/ml ²

² AGU = amyloglukosidase unit (množství enzymu, které rozštěpí 1 μ mol maltosy za minutu při standardizovaných podmínkách pro stanovení glukoamylasy)

2.1.2 Chemikálie

2.1.2.1 Úprava pH chleba

- kyselina sírová 96% - p.a., Lach-Ner s.r.o., H_2SO_4
- hydroxid sodný - čistý, PENTA, NaOH
- destilovaná voda, H_2O

2.1.2.2 Stanovení redukujících cukrů

- kyselina sírová 96% - p.a., Lach-Ner s.r.o., H_2SO_4
- uhličitan sodný bezvodý - PENTA, Na_2CO_3
- hydrogenuhličitan sodný - PENTA, NaHCO_3
- Seignettova sůl - p.a., Lach-Ner s.r.o., $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- síran sodný - p.a., Lach-Ner s.r.o., Na_2SO_4
- pentahydrát síranu měďnatého - p.a., Lach-Ner s.r.o., $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- molybdenan amonný tetrahydrát - MACH Chemikálie s.r.o., $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- heptahydrát hydrogenarseničnanu sodného - Sigma-Aldrich Co., $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- D-maltosa monohydrát - Carl Roth, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$
- D-glukóza bezvodá - p.a., PENTA, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- destilovaná voda, H_2O

2.1.2.3 Příprava kultivačních médií

- kvasničný extrakt (pro bakteriologii) - Carl Roth
- síran amonný - p.a., Lach-Ner s.r.o., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- dihydrogenfosforečnan draselný - p.a. Lach-Ner s.r.o., KH_2PO_4
- síran hořečnatý heptahydrát - p.a., Lach-Ner s.r.o., $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- D-glukóza bezvodá - p.a., PENTA, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_{11}$
- destilovaná voda, H_2O

2.1.2.4 Příprava kalibračních roztoků pro HPLC

- D-glukóza bezvodá - p.a., Lach-Ner s.r.o., $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- ethanol absolutní - p.a., Merck s.r.o., $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$
- glycerol - p.a., Lachema a.s., $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$
- destilovaná voda, H_2O

2.1.2.5 Ostatní

- methanol HPLC pro analýzu - Lach-Ner s.r.o., CH_4O
- kyselina sírová 96% - p.a., Lach-Ner s.r.o., H_2SO_4

2.1.3 Kultura

Pro fermentaci byla použita kultura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080 pocházející z české národní sbírky typových kultur. [71]

2.1.4 Substrát

Odpadní chléb z kavárny Zastávka. Pro experimenty byl vybrán pšenično-žitný chléb obsahující pšeničnou mouku, žitnou mouku, vodu, droždí, zlepšující přípravek, sůl a sušený kvas.

2.1.5 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Pioneer™ OHAUS
- Centrifuga Micro 120 Hettich
- Elektrický vaříč ETA dvouplotýnkový
- HPLC
 - detektor UV/VIS ECOM s.r.o.
 - diferenciální refraktometr RID K 101
 - pumpa ECOM s.r.o.
 - auto-sampler HT 300
 - termostat kolonový LCO 101 ECOM s.r.o.
- Inkubátor VWR INCU-Line IL 115
- Kombinovaná chladnička BOSCH
- Minitřepačka lab dancer vario IKA
- pH metr tužkový Testo 206
- pH metr Hanna instruments pH 211
- Spektrofotometr Helios ε
- Sušárna UM 500 Memmert
- Temperovaná třepačka
 - třepačka Heidolph UNIMAX 1010
 - inkubátor Heidolph 1000
- Temperovaná vodní lázeň
- Termostat Memmert
- Turbidimetr Ultrospec 10 AP Czech
- Tyčový mixer Moulinex Faciclick, 450 W
- Ultrapur DeltaChrom
- Ultrazvuková čistička Ultrasound
- Váhy elektronické Helago EK-300
- Váhy elektronické OHAUS

2.1.6 Software

- Microsoft Word 2010, Microsoft Excel 2010
- Clarity Chromatography Station 2.6.6.574
- ChemSketch (úprava a výroba obrázků)

2.2 Příprava roztoků

2.2.1 Inokulační a kultivační médium pro *Saccharomyces cerevisiae*

Kultivační médium bylo připraveno rozpuštěním příslušného množství živin v destilované vodě dle *Tabulka 5*. Množství jednotlivých živin byla přepočítána vždy na požadovaný objem.

Tabulka 5 - Tabulka navážek jednotlivých složek média na 1000 ml vody

složka média	m [g]
kvasničný extrakt	4
KH_2PO_4	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
glukosa	100

2.2.2 Příprava roztoků na úpravu pH pro hydrolýzy

Pro úpravu pH chlebové suspenze byly připraveny roztoky zředěné kyseliny a zásady, a to 1% w/v roztok H_2SO_4 a 1% w/v roztok NaOH, jelikož tyto roztoky byly vyhodnoceny pokusy jako optimální.

Navážka NaOH odpovídající 1% w/v roztoku na 100 ml roztoku činila 1 g NaOH. Navážka byla rozpuštěna v kádince s destilovanou vodou a kvantitativně převedena do odměrné baňky (100 ml). Roztok v odměrné baňce byl doplněn destilovanou vodou po rysku tak, že se dolní meniskus dotýkal rysky.

Podobným způsobem byl připraven i 1% w/v roztok H_2SO_4 . Do odměrné baňky o objemu 100 ml s destilovanou vodou bylo napipetováno 569 μl 96% H_2SO_4 a doplněno destilovanou vodou po rysku tak, aby se dolní meniskus dotýkal rysky.

2.2.3 Příprava kalibračních roztoků glukosy a maltosy pro stanovení metodou Somogyi-Nelsona

Byly připraveny kalibrační roztoky glukosy a maltosy. Nejdříve byl namíchán 2% w/v roztok maltosy, který byl brán jako nejvyšší koncentrace této látky. Pro glukosu byl namíchán 1% w/v roztok, jako nejvyšší koncentrace této látky. Dále bylo postupným ředěním přichystáno 10 roztoků o rostoucí koncentraci, dle tabulky 6.

Tabulka 6 - Příprava kalibrační řady jednotlivých složek

	c [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]									
glukosa	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10
maltosa	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20

2.2.4 Příprava roztoků pro stanovení redukcí cukrů metodou Somogyi-Nelsona

Pro stanovení redukcí cukrů metodou Somogyi-Nelsona bylo třeba připravit 3 reakční roztoky. Somogyiho roztok I byl připraven navážením 24 g bezvodého Na_2CO_3 , 16 g NaHCO_3 , 12 g Seignettovy soli ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) a 144 g Na_2SO_4 . Jednotlivé navážky byly kvantitativně převedeny do kádinky, doplněny destilovanou vodou na 800 ml a rozpuštěny. Dále byl připraven Somogyiho roztok II navážením 4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ a 36 g bezvodého Na_2SO_4 . Navážky byly opět kvantitativně převedeny do kádinky, doplněny destilovanou vodou na 200 ml a rozpuštěny. Jako poslední bylo namícháno Nelsonovo činidlo navážením 25 g molybdenanu amonného ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), který byl rozpuštěn ve 450 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 21 ml H_2SO_4 . Roztok molybdenanu amonného a kyseliny sírové byl smíchán s roztokem vzniklým navážením 2,0 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěním ve 25 ml destilované vody. Všechny navážky byly provedeny s přesností na 0,01 g. Nelsonův roztok byl před použitím temperován v termostatu 48 hodin při 37 °C. Dále bylo nutno tento roztok přechovávat v hnědé lahvi se zábrusem za nepřístupu světla. [56]

2.2.5 Mobilní fáze pro přístroj HPLC

Jako mobilní fáze pro analýzu sacharidů, ethanolu a glycerolu byl zvolen $5 \cdot 10^{-3}$ M roztok kyseliny sírové. Do 1000 ml odměrné baňky s deionizovanou vodou bylo napipetováno 279 μl H_2SO_4 . Po doplnění po rysku byl roztok důkladně promíchán a zfiltrován přes membránový filtr Pragopor 6 s velikostí pórů $0,40 \pm 0,06 \mu\text{m}$. Tím byla mobilní fáze zbavena případných nečistot. Případné vzduchové bublinky byly z roztoku odstraněny na ultrazvuku po dobu 15 minut. Nevyužitá mobilní fáze byla uchována v lednici při 4 °C.

2.2.6 Příprava kalibračních roztoků glukosy, ethanolu a glycerolu pro stanovení metodou HPLC

Byly připraveny kalibrační roztoky glukosy, ethanolu a glycerolu. Nejdříve byly namíchány roztoky o nejvyšší koncentraci těchto látek. Dále bylo postupným ředěním přichystáno 10 roztoků o rostoucí koncentraci, dle tabulky 7.

Tabulka 7- Příprava kalibrační řady jednotlivých složek

	c [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]									
glukosa	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
ethanol	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
glycerol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

2.3 Kultivace a stanovení růstové křivky

Bylo připraveno inokulum rozkultivováním biomasy ve 250 ml sterilního kultivačního média (viz kapitola 2.2.1), které bylo zaočkováno 10 ml zamražené kultury. Baňka byla umístěna na temperovanou třepačku s nastavenou teplotou 30 °C a 150 min^{-1} . Kultivace probíhala 12 hodin.

Po této době bylo odebráno 25 ml inokula a přidáno do 250 ml sterilního kultivačního média. Celkem takto byly připraveny 4 baňky, ve kterých byly stanoveny růstové křivky. Byly připraveny 2 sady baněk, mezi kterými byl rozestup v kultivaci 12 hodin, aby byla pokryta růstová křivka i během noci. Každá sada obsahovala 2 baňky, kdy jedna byla kultivována na třepačce při 30 °C a 150 min^{-1} a druhá v termostatu bez třepání při 30 °C.

Konkrétní stanovení růstových křivek probíhalo tak, že v průběhu kultivace byly odebírány vzorky v hodinových intervalech a následně byla měřena optická hustota (OD, optical density) pomocí turbidimetru Ultrospec 10 s přednastavenou vlnovou délkou 600 nm. Jako blank bylo použito kultivační médium. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Pokud byla výsledná absorbance vyšší než 1, byl vzorek i blank zředěn destilovanou vodou.

2.4 Předúprava vzorku

2.4.1 Mletí chleba

Kusy suchého chleba byly rozbity kladivem na menší kousky, které byly rozemlety pomocí elektrického sekáčku na potraviny na malé částice. U namletého chleba byla provedena síťová analýza velikosti částic. Poté byl sterilován pod UV lampou a uchováván v lednici při 4 °C.

2.4.2 Síťová analýza velikosti částic

Pro charakterizaci substrátu, byla provedena analýza velikosti částic. Tato analýza byla provedena přesíváním rozemletého chleba přes soustavu sít s různými velikostmi ok. Po přesetí předem zváženého množství analyzovaného vzorku, bylo zváženo množství vzorku zachyceného na každém ze zvolených sít. Celý postup byl proveden pětkrát. Z naměřených dat byl sestaven graf hmotnostní distribuce částic v závislosti na jejich velikosti.

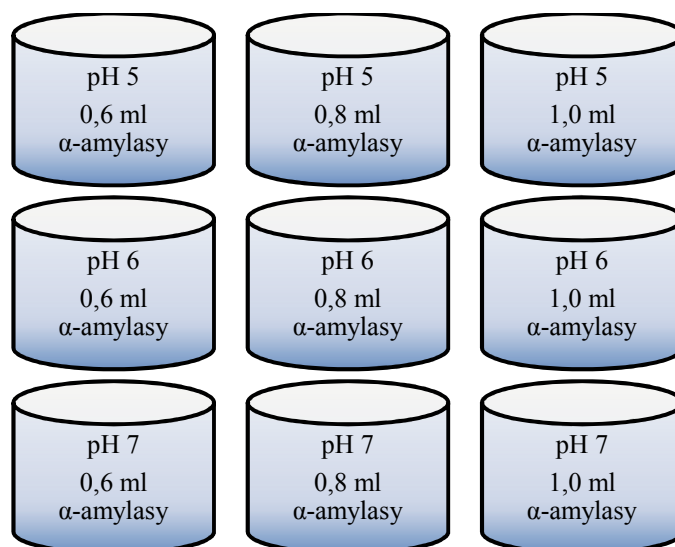
2.4.3 Příprava vzorku

Namleté částice byly rozděleny pomocí síta o velikosti ok 1,25 mm na částice o dané velikosti a menší. Větší částice způsobovaly vysokou hustotu suspenze, při 15% w/v suspenzi absorbovaly veškerou vodu. K přílišné absorpci vody docházelo také při vyšší koncentraci chleba v suspenzi. Větší částice, které sítím neprošly, byly dále rozemlety pomocí tyčového mixéru a znovu prosety přes síto o velikosti ok 1,25 mm z důvodu

2.5 Enzymatické hydrolýzy

2.5.1 Ztekucení

Ke ztekucení substrátu byl použit enzym α -amylasa z *B. amyloliquefaciens*. Substrátem bylo 100 ml 15% w/v suspenze chleba a vody. Při ztekucení byly optimalizovány teplota, pH a množství enzymu. Celkem bylo nachystáno 27 baněk o objemu 250 ml se suspenzí chleba: 15 g namletého chleba (viz kapitola 2.3.1) a 85 ml sterilní destilované vody upravené na požadované pH (5, 6 a 7). Voda byla připravena tak, že bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu a poté byla dána do tlakového hrnce ke sterilizaci. Těsně před začátkem hydrolýzy byla napipetována 3 různá množství enzymu: 0,6 ml·kg⁻¹, 0,8 ml·kg⁻¹, 1,0 ml·kg⁻¹ (pozn. na kg suchého chleba), tj. 9 μ l, 12 μ l a 15 μ l α -amylasy pro námi zvolenou suspenzi (viz obrázek 16). Byly aplikovány 3 teploty ztekucení, a to 70 °C, 80 °C a 90 °C. Hydrolýza probíhala celkově 4 hodiny a vzorky byly odebírány v půlhodinových intervalech. Všechny vzorky byly stanoveny třikrát metodou Somogyi-Nelsona.



Obrázek 16 - Hodnoty pH a množství enzymů v jednotlivých baňkách pro jednu teplotu

2.5.2 Sacharifikace

Na sacharifikaci, neboli zcukření, byl použit enzym glukoamylasa z *A. niger*. Byl sacharifikován předem ztekucený vzorek α-amylasou, který dle výsledků vykazoval nejvyšší hodnoty redukujících cukrů, u kterého došlo k nejintenzivnějšímu ztekucení. Při sacharifikaci byly optimalizovány teplota, pH a množství enzymu. Celkem bylo nachystáno 27 baňek o objemu 250 ml se ztekucenou suspenzí chleba. Suspenze byla po ztekucení ochlazená pro ukončení činnosti α-amylasy a uschována v lednici při 4 °C. Poté bylo upraveno pH na hodnoty 3,2; 4,2 a 5,2. Těsně před začátkem hydrolýzy byla napipetována 3 různá množství enzymu: 0,6 ml·kg⁻¹, 0,8 ml·kg⁻¹, 1,0 ml·kg⁻¹ (pozn. na kg suchého chleba), tj. 9 μl, 12 μl a 15 μl glukoamylasy pro námi zvolenou suspenzi. Byly aplikovány 3 teploty sacharifikace, a to 55 °C, 60 °C a 65 °C. Hydrolýza probíhala celkově 1 hodinu a 45 minut. Vzorky byly odebírány v patnáctiminutových intervalech. Všechny vzorky byly stanoveny třikrát metodou Somogyi-Nelsona i pomocí HPLC.

2.5.3 Kombinovaná hydrolýza

Také byl studován vliv společného působení obou enzymů na hydrolýzu. Byly provedeny dva různé způsoby přidání obou enzymů. Podle deklarovaných vlastností obou enzymů bylo stanoveno pH a dvě teploty, při které byly schopny pracovat oba enzymy současně. Bylo zvoleno pH 5,5 a aplikovány dvě různé teploty 65 a 70 °C, z toho 65 °C bylo s třepáním 130 min⁻¹ a 70 °C bez třepání.

Pro srovnání s postupnou hydrolýzou byla i zde použita 15% w/v chlebová suspenze o objemu 100 ml jako substrát. Při prvním způsobu bylo do suspenze aplikováno 12 μl α-amylasy a stejné množství glukoamylasy. Jedna z baňek byla dána na temperovanou třepačku s nastavenou teplotou 65 °C a mícháním 130 min⁻¹ a druhá baňka byla dána do termostatu s nastavenou teplotou 70 °C. Po 4 hodinách byla hydrolýza ukončena. Interval mezi jednotlivými odběry byl 30 minut. Jednotlivé odběry byly stanoveny třikrát metodou Somogyi-Nelsona i pomocí HPLC. Ve výsledcích je tento způsob značen jako „směsná 1“.

Druhá metoda byla prováděna obdobně, jen s tím rozdílem, že enzymy byly přidávány postupně. Tedy nejprve bylo do chlebové suspenze přidáno 12 μl α-amylasy a baňky byly dány do termostatu a na temperovanou třepačku. Po 2 hodinách působení α-amylasy bylo

do baněk přidáno 12 µl glukoamylasy. Po přidání byla suspenze hydrolyzována ještě 1,5 hodiny. První dvě hodiny byly odběry prováděny po 30 minutách, po přidání glukoamylasy se interval mezi jednotlivými odběry snížil na 15 minut. I zde byly vzorky stanoveny třikrát metodou Somogyi-Nelsona i HPLC. Ve výsledcích je tato metoda značena jako „směsná 2“.

2.6 Fermentace

Stejně jako růstová křivka i fermentace byla provedena ve 2 sadách, aby byl pokryt celkový průběh produkce. Baňky se 100 ml 15% w/v chlebové suspenze byly hydrolyzovány druhou metodou kombinované hydrolýzy při 65 °C a míchání 130 min⁻¹. Poté byly baňky schlazeny. V každé sadě byla u jedné baňky upravena hodnota pH na 5 a u další pH nebylo upravováno. Na úpravu byly použity stejné roztoky, jako pro úpravu pH u hydrolýzy (viz kapitola 2.2.2), v tomto případě byly roztoky vysterilizovány v tlakovém hrnci. Inokulum bylo naředěno sterilní vodou na OD = 0,5 a hydrolyzáty byly zaočkovány 10 ml naředěného inokula. Po zaočkování byly baňky dány do termostatu a kultivovány při 30 °C. Vzorky byly odebrány po 2 hodinách po dobu 66 hodin. Jednotlivé vzorky byly analyzovány metodou HPLC.

2.6.1 Analýza metodou Somogyi-Nelsona

Těsně před samotným stanovením byly smíchány Somogyiho roztoky I a II (viz 2.2.4) v poměru 4:1. Z této směsi byl odpipetován 1 ml do zkumavky. Ke směsi byl přidán 1 ml standardního roztoku pro kalibraci nebo 1 ml vzorku po centrifugaci. Do zkumavky pro slepý vzorek byla pipetována destilovaná voda. Po důkladném promíchání byly zkumavky vloženy do vroucí vodní lázně na 15 minut. Zkumavky i s obsahem byly ochlazeny na laboratorní teplotu a byly přidány 2 ml Nelsonova činidla (viz 2.2.4). Po promíchání byly zkumavky ponechány po dobu 2 minut a poté byl obsah doplněn destilovanou vodou na objem 10 ml. Roztok byl dokonale promíchán pomocí vortexu a byla proměřena intenzita modrozeleného zabarvení pomocí spektrofotometru proti slepému vzorku při 540 nm. Pro standardní roztoky byly sestrojeny kalibrační křivky a byly zjištěny rovnice lineární regrese. Koncentrace složek v odebraných vzorcích byly stanoveny přepočtem přes rovnici lineární regrese tak, že po hydrolýze α -amylasou byly vzorky přepočteny na maltosu a pro hydrolýzu glukoamylasou byly koncentrace přepočteny na glukosu. Všechna měření byla provedena třikrát.

2.6.2 Analýza metodou HPLC

K analýze metodou HPLC byla použita jako mobilní fáze 5·10⁻³ M roztok H₂SO₄ (viz 2.2.5). Velikost průtoku mobilní fáze byla nastavena na hodnotu 1 ml·min⁻¹ a byla konstantní po celou dobu měření. Doba analýzy kalibračních roztoků glukosy a vzorků po hydrolýze byla 7 minut. Pro roztoky ethanolu a vzorky po fermentaci byla doba analýzy 15 minut. Pro standardní roztoky byly zjištěny retenční časy jednotlivých látek a sestrojeny kalibrační křivky na základě plochy příslušných píků. Koncentrace složek v odebraných vzorcích byly stanoveny přepočtem přes rovnici lineární regrese, která byla získaná z kalibračních křivek.

2.7 Statistické zpracování výsledků

Všechny získané hodnoty byly stanoveny třikrát. U těchto hodnot byl vypočítán průměr pomocí funkce PRŮMĚR, vždy pro tři měření, a hodnota intervalu spolehlivosti pomocí funkce CONFIDENCE v programu Microsoft Excel 2010. Byla zvolena hladina statistické významnosti $\alpha = 0,05$.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Kultivace a stanovení růstových křivek

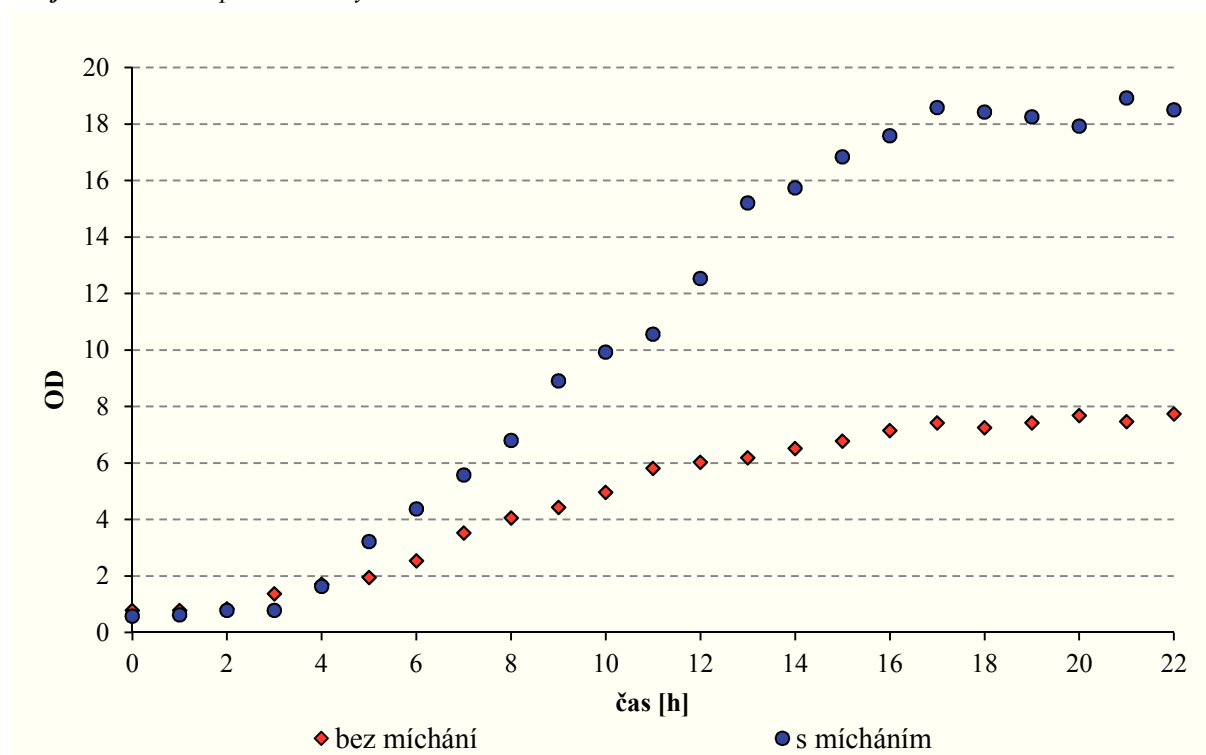
Byl studován růst *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080 za podmínek uvedených v kapitole 2.3. Růst byl sledován jako závislost hodnoty optické hustoty (OD) na čase. Naměřené hodnoty byly shrnuty v tabulce 8 a vyneseny do Grafu 1.

Tabulka 8 - Naměřené hodnoty optické hustoty

kultivace bez míchání		
čas [h]	OD	ředění
0	$0,780 \pm 0,000$	-
1	$0,780 \pm 0,009$	
2	$0,837 \pm 0,005$	
3	$1,367 \pm 0,005$	2 x
4	$1,707 \pm 0,005$	
5	$1,940 \pm 0,005$	6 x
6	$2,540 \pm 0,005$	
7	$3,520 \pm 0,005$	
8	$4,053 \pm 0,005$	8 x
9	$4,427 \pm 0,009$	
10	$4,960 \pm 0,005$	
11	$5,813 \pm 0,005$	16 x
12	$6,027 \pm 0,005$	
13	$6,187 \pm 0,005$	
14	$6,507 \pm 0,005$	
15	$6,773 \pm 0,005$	
16	$7,147 \pm 0,005$	
17	$7,413 \pm 0,005$	
18	$7,253 \pm 0,005$	
19	$7,413 \pm 0,005$	
20	$7,680 \pm 0,000$	
21	$7,467 \pm 0,005$	
22	$7,733 \pm 0,005$	

kultivace s mícháním		
čas [h]	OD	ředění
0	$0,570 \pm 0,000$	-
1	$0,620 \pm 0,000$	
2	$0,783 \pm 0,005$	
3	$0,773 \pm 0,005$	2 x
4	$1,627 \pm 0,011$	
5	$3,213 \pm 0,005$	4 x
6	$4,373 \pm 0,005$	8 x
7	$5,573 \pm 0,014$	
8	$6,800 \pm 0,00$	
9	$8,907 \pm 0,005$	16 x
10	$9,920 \pm 0,000$	
11	$10,560 \pm 0,009$	
12	$12,533 \pm 0,005$	
13	$15,200 \pm 0,000$	25 x
14	$15,733 \pm 0,005$	
15	$16,833 \pm 0,005$	
16	$17,583 \pm 0,005$	
17	$18,583 \pm 0,005$	
18	$18,417 \pm 0,005$	
19	$18,250 \pm 0,009$	
20	$17,917 \pm 0,014$	
21	$18,917 \pm 0,005$	
22	$18,500 \pm 0,009$	

Graf 1 - Závislost optické hustoty na čase



Na grafu 1 je možné vidět, že u kultivace s mícháním byla lag fáze po dobu asi 3 hodin, u kultivace bez míchání trvala tato fáze asi 2 hodiny. V průběhu této fáze dochází k přizpůsobení buněk na prostředí. Délku lag fáze zřejmě ovlivnilo i nedostatečné vytemperování kultivačního média před zaočkováním. Poté následovala fáze exponenciálního růstu. U obou růstových křivek je zřejmý konec exponenciální fáze asi v 17. hodině. Z výsledku je možno usoudit, že při míchání je výtěžek biomasy zhruba dvojnásobný. Od asi 17. hodiny nastává fáze stacionární. Dostatečná produktivita jak biomasy, tak metabolitu, je zabezpečena zaočkováním buněk z inokula, které mají nejvyšší fyziologickou aktivitu. Z tohoto důvodu bylo inokulum vždy kultivováno po dobu 12 hodin.

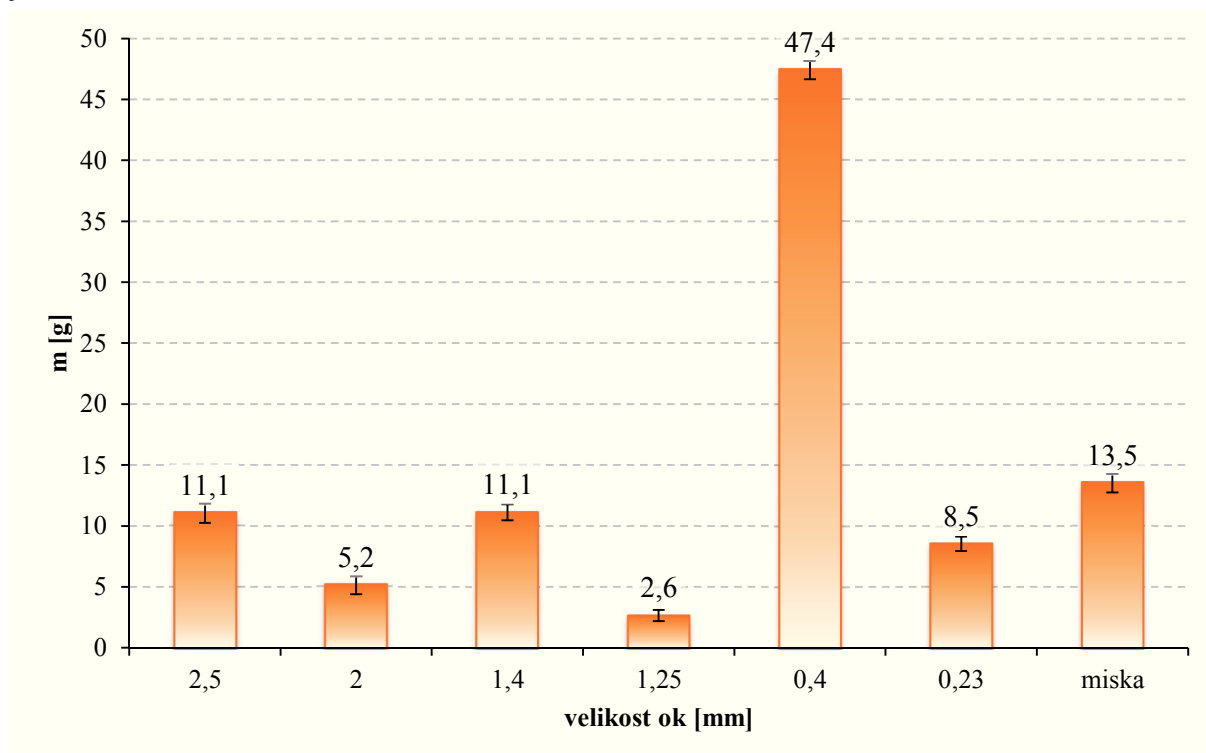
3.2 Sítová analýza velikosti částic

Stanovení velikosti částic bylo uskutečněno pomocí soustavy sít (viz 2.4.2). Byla použita síta s velikostí ok 2,5; 2; 1,4; 1,25; 0,4 a 0,23 mm. Na sítovou analýzu bylo vždy naváženo 100 g rozemletého chleba s přesností na 0,01 g. Výsledky uvádí tabulka 9 a graf 2.

Tabulka 9 - Hmotnostní distribuce velikosti částic

velikost ok [mm]	m ₁ [g]	m ₂ [g]	m ₃ [g]	m ₄ [g]	m ₅ [g]
2,5	12,06	10,04	11,86	9,87	11,47
2	3,74	5,62	6,40	4,98	5,07
1,4	10,10	11,04	11,80	10,57	12,07
1,25	2,05	2,94	1,97	3,16	3,12
0,4	48,36	48,32	46,58	47,81	46,17
0,23	9,45	8,30	7,47	8,35	9,08
miska	13,23	13,15	13,80	15,07	12,39
Σ	98,99	99,41	99,88	99,81	99,37

Graf 2 - Hmotnostní distribuce velikosti částic



Zbytek na sítích a v misce byl zvážěn s přesností 0,01 g. Z tabulky 9 je zřejmé, že při měření vznikly ztráty, které byly zřejmě způsobeny zachycením částic chleba v některém ze sít. Nejvíce částic po prvním rozemletí na mixéru mělo velikost 0,4 - 1,25 mm, a to v průměru 47,4 % navážky, zanedbáme-li ztráty na sítích.

3.3 Enzymatické hydrolýzy

3.3.1 Ztekucení

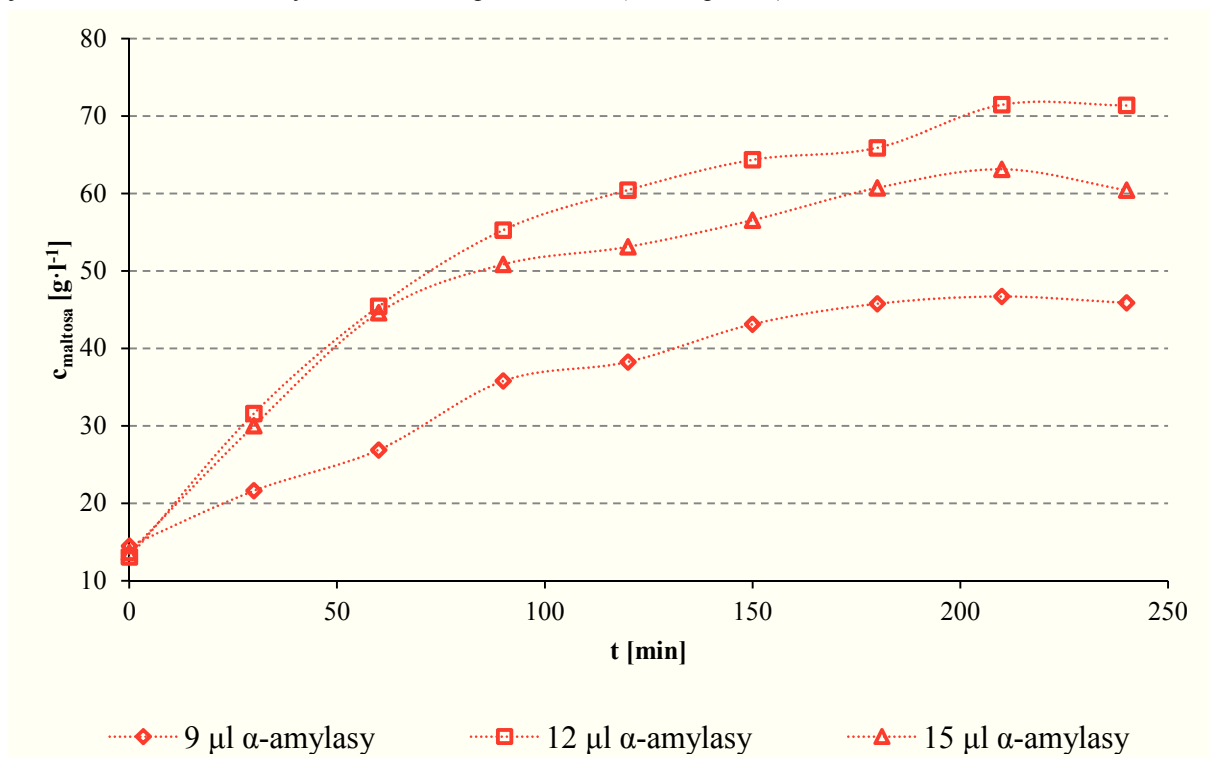
Bylo provedeno ztekucení α -amylasou z *B. amyloliquefaciens* za podmínek uvedených v kapitole 2.5.1. Pro sledování průběhu enzymatické hydrolýzy α -amylasou byla použita analýza metodou Somogyi-Nelsona, pomocí které bylo v jednotlivých odběrech během hydrolýzy stanoveno množství redukujících cukrů. Pro výpočet koncentrace redukujících cukrů byla použita kalibrační křivka maltosy (viz Příloha). Jednotlivé výsledky jsou uvedeny v tabulkách 10 až 12 a grafech 3 až 13.

Tabulka 10 - Hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ vzniklých redukujících cukrů v průběhu ztekucení při teplotě 70 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti

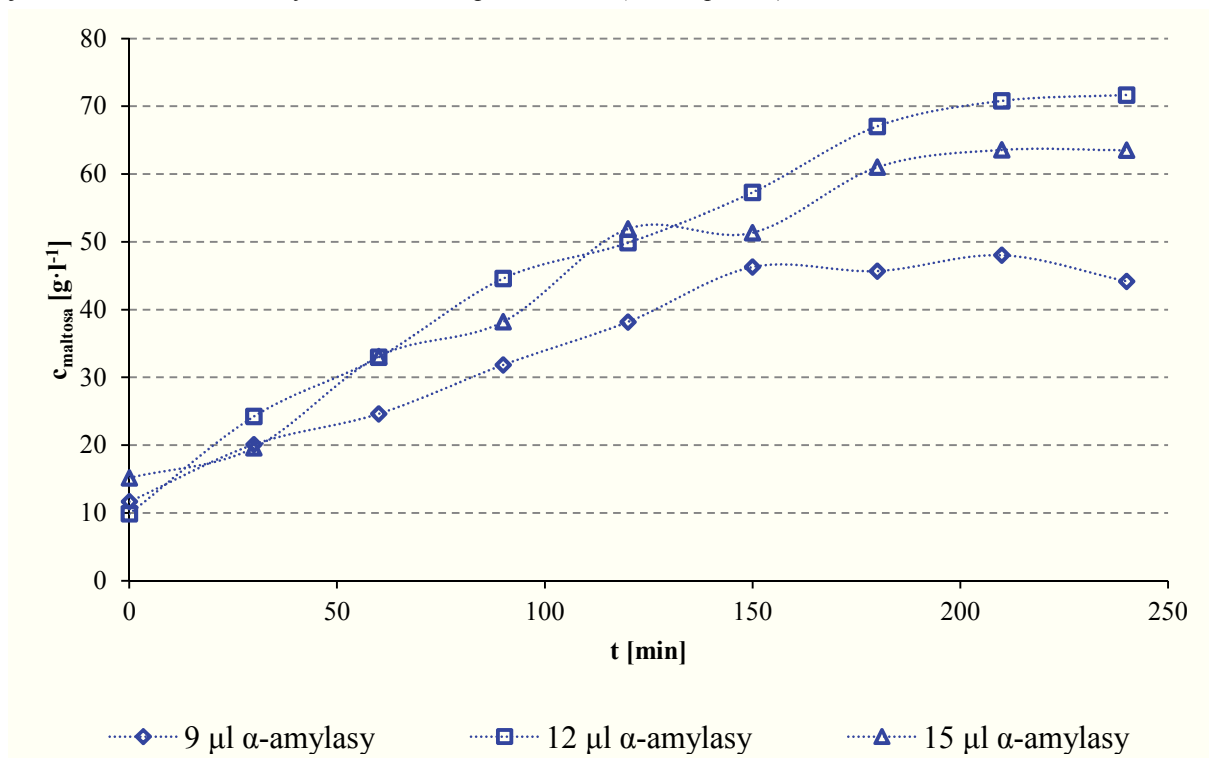
čas [min]	pH 5; 9 μ l α -amylasy	pH 5; 12 μ l α -amylasy	pH 5; 15 μ l α -amylasy
0	14,48 \pm 0,03	13,06 \pm 0,05	13,63 \pm 0,07
30	21,6 \pm 1,3	31,58 \pm 0,17	30,0 \pm 0,2
60	26,89 \pm 0,09	45,4 \pm 1,6	44,60 \pm 0,06
90	35,79 \pm 0,09	55,3 \pm 1,0	50,8 \pm 0,6
120	38,25 \pm 0,06	60,4 \pm 0,9	53,1 \pm 0,3

150	$43,1 \pm 1,5$	64 ± 4	$56,6 \pm 0,6$
180	$45,75 \pm 0,09$	66 ± 2	$60,7 \pm 0,2$
210	$46,7 \pm 0,2$	$71,45 \pm 0,13$	$63,12 \pm 0,06$
240	46 ± 2	$71,4 \pm 1,6$	$60,4 \pm 0,7$
čas [min]	pH 6; 9 μl α-amylasy	pH 6; 12 μl α-amylasy	pH 6; 15 μl α-amylasy
0	$11,66 \pm 0,04$	$9,9 \pm 0,4$	$15,17 \pm 0,02$
30	$20,1 \pm 0,8$	$24,24 \pm 0,14$	$19,58 \pm 0,06$
60	$24,62 \pm 0,09$	$32,95 \pm 0,12$	$33,08 \pm 0,06$
90	$31,8 \pm 0,3$	$44,6 \pm 0,3$	$38,21 \pm 0,13$
120	$38,2 \pm 1,3$	$49,9 \pm 0,2$	$51,9 \pm 0,4$
150	$46,3 \pm 0,3$	$57,3 \pm 0,7$	$51,3 \pm 1,1$
180	$45,7 \pm 0,4$	67 ± 3	61 ± 4
210	48 ± 3	$70,8 \pm 0,5$	$63,55 \pm 0,19$
240	$44,2 \pm 0,2$	$71,7 \pm 0,4$	$63,5 \pm 1,1$
čas [min]	pH 7; 9 μl α-amylasy	pH 7; 12 μl α-amylasy	pH 7; 15 μl α-amylasy
0	$13,47 \pm 0,18$	$12,2 \pm 0,7$	$14,74 \pm 0,02$
30	$19,26 \pm 0,03$	$33,24 \pm 0,06$	$22,0 \pm 1,6$
60	$27,7 \pm 1,6$	$43,16 \pm 0,06$	$31,25 \pm 0,12$
90	$37,1 \pm 0,4$	49 ± 3	$33,7 \pm 0,2$
120	$35,83 \pm 0,12$	$54,8 \pm 0,3$	$39,6 \pm 0,2$
150	$38,2 \pm 0,5$	$55,37 \pm 0,13$	$46,9 \pm 0,3$
180	$44,3 \pm 1,0$	$62,9 \pm 0,3$	$53,98 \pm 0,18$
210	$44,2 \pm 0,2$	$63,3 \pm 0,4$	$53,39 \pm 0,15$
240	$44,0 \pm 0,8$	$63,1 \pm 0,4$	$55,42 \pm 0,09$

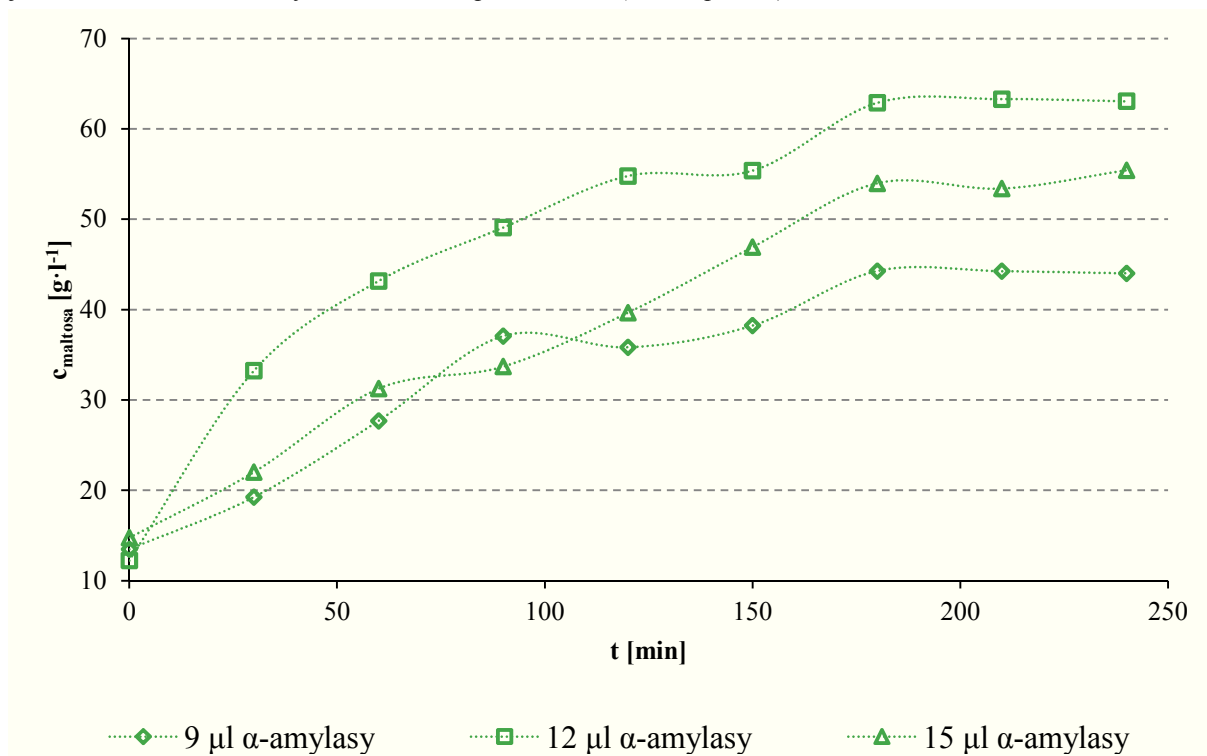
Graf 3 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (70 °C; pH 5,0)



Graf 4 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (70 °C; pH 6,0)



Graf 5 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (70 °C; pH 7,0)



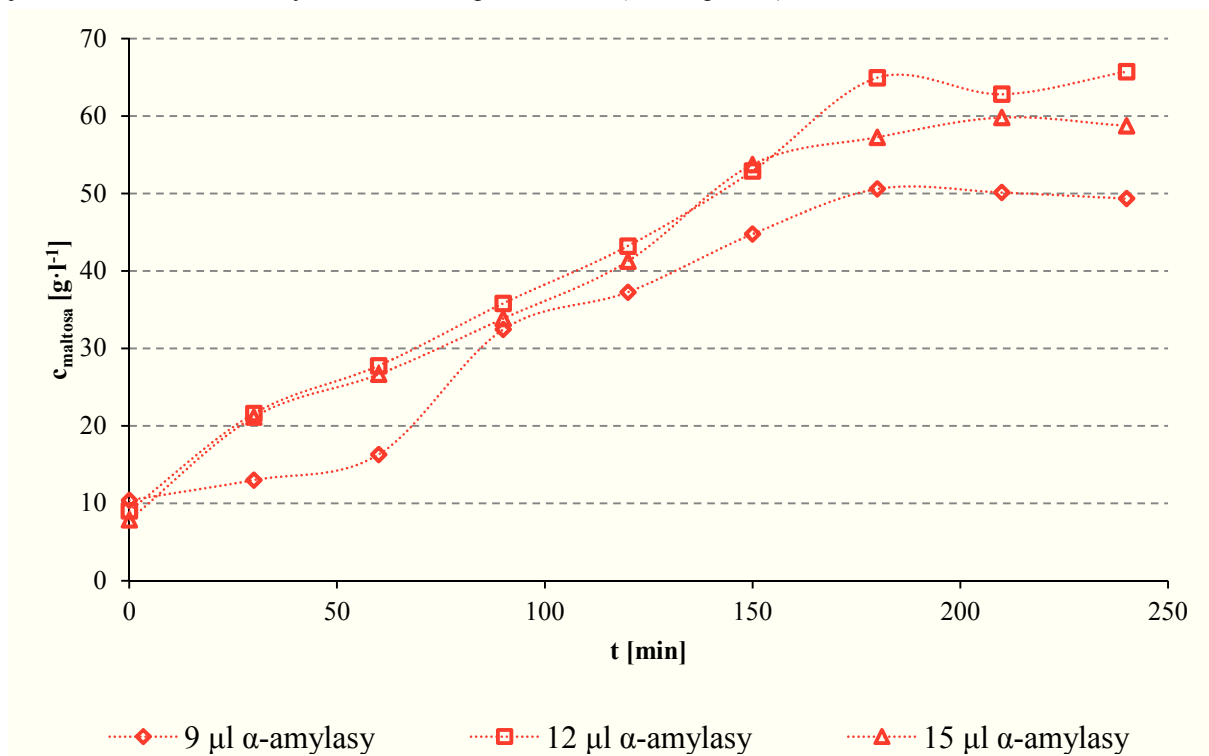
V tabulce 10 jsou uvedeny naměřené hodnoty redukujících cukrů při 70 °C metodou Somogyi-Nelsona s intervaly spolehlivosti. Jelikož některé hodnoty intervalů spolehlivosti vycházely relativně malé, nemohly být znázorněny v grafech jako chybové úsečky. Z grafů 3 až 5 je patrný průběh hydrolýzy α -amylasou při teplotě 70 °C a vliv pH a množství enzymu na účinnosti ztekucení. Z grafů je patrné, že za různého pH a stejné teploty bylo nejúčinnější množství α -amylasy 12 μ l. V případě použití pH 5,0 a 6,0 je možné pozorovat konec ztekucení zhruba po 210 minutách, v případě pH 7,0 je konec pozorován již po 180 minutách působení enzymu. Určení nejvhodnějšího množství enzymu, teploty a pH pro ztekucení je shrnuto a znázorněno v grafech 12 a 13.

Tabulka 11 - Hodnoty koncentrací [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] vzniklých redukujících cukrů v průběhu ztekucení při teplotě 80 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti

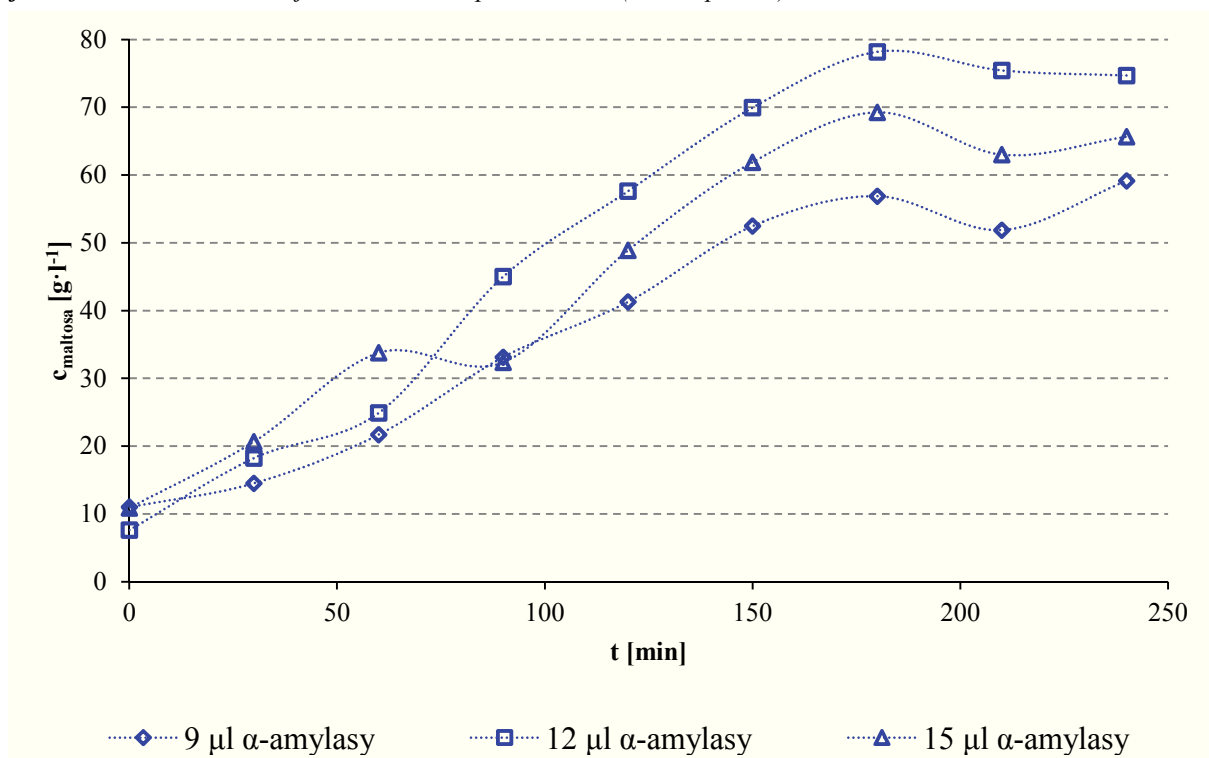
čas [min]	pH 5; 9 μ l α -amylasy	pH 5; 12 μ l α -amylasy	pH 5; 15 μ l α -amylasy
0	10,4 \pm 0,3	9,0 \pm 0,6	7,9 \pm 0,4
30	13,00 \pm 0,13	21,6 \pm 1,1	21,1 \pm 1,5
60	16,3 \pm 1,6	27,8 \pm 0,3	26,64 \pm 0,06
90	32 \pm 6	35,8 \pm 0,7	34 \pm 2
120	37 \pm 2	43,2 \pm 1,5	41,2 \pm 1,4
150	45 \pm 3	53 \pm 2	53,7 \pm 0,2
180	50,6 \pm 1,9	65 \pm 3	57,2 \pm 0,5
210	50,11 \pm 0,09	62,8 \pm 1,3	59,8 \pm 0,5
240	49,3 \pm 0,2	65,7 \pm 1,4	58,7 \pm 1,8

čas [min]	pH 6; 9 μl α-amylasy	pH 6; 12 μl α-amylasy	pH 6; 15 μl α-amylasy
0	11,0 \pm 0,5	7,6 \pm 0,5	10,9 \pm 0,5
30	14,5 \pm 0,6	18,2 \pm 1,3	20,65 \pm 0,07
60	21,7 \pm 0,8	24,9 \pm 1,1	33,8 \pm 1,2
90	33,1 \pm 1,1	45,0 \pm 0,3	32,4 \pm 0,4
120	41,3 \pm 1,8	57,60 \pm 0,19	48,9 \pm 0,9
150	52,47 \pm 0,09	70 \pm 3	61,9 \pm 0,2
180	57 \pm 3	78 \pm 2	69,3 \pm 0,2
210	52 \pm 3	75,4 \pm 0,6	63,0 \pm 1,5
240	59 \pm 3	74,7 \pm 0,4	65,65 \pm 0,19
čas [min]	pH 7; 9 μl α-amylasy	pH 7; 12 μl α-amylasy	pH 7; 15 μl α-amylasy
0	8,6 \pm 0,06	7,3 \pm 0,5	10,037 \pm 0,015
30	10,4 \pm 0,9	19,78 \pm 0,08	19,18 \pm 0,06
60	21,4 \pm 0,9	25 \pm 2	30,0 \pm 1,5
90	28 \pm 3	34 \pm 2	31,79 \pm 0,15
120	37,94 \pm 0,09	40 \pm 4	45 \pm 3
150	48,9 \pm 0,4	51,4 \pm 0,2	50,8 \pm 0,2
180	48,2 \pm 0,3	55,4 \pm 0,3	54 \pm 3
210	49 \pm 3	57,0 \pm 0,4	53,5 \pm 1,1
240	48,1 \pm 0,5	55,7 \pm 0,4	54,4 \pm 1,2

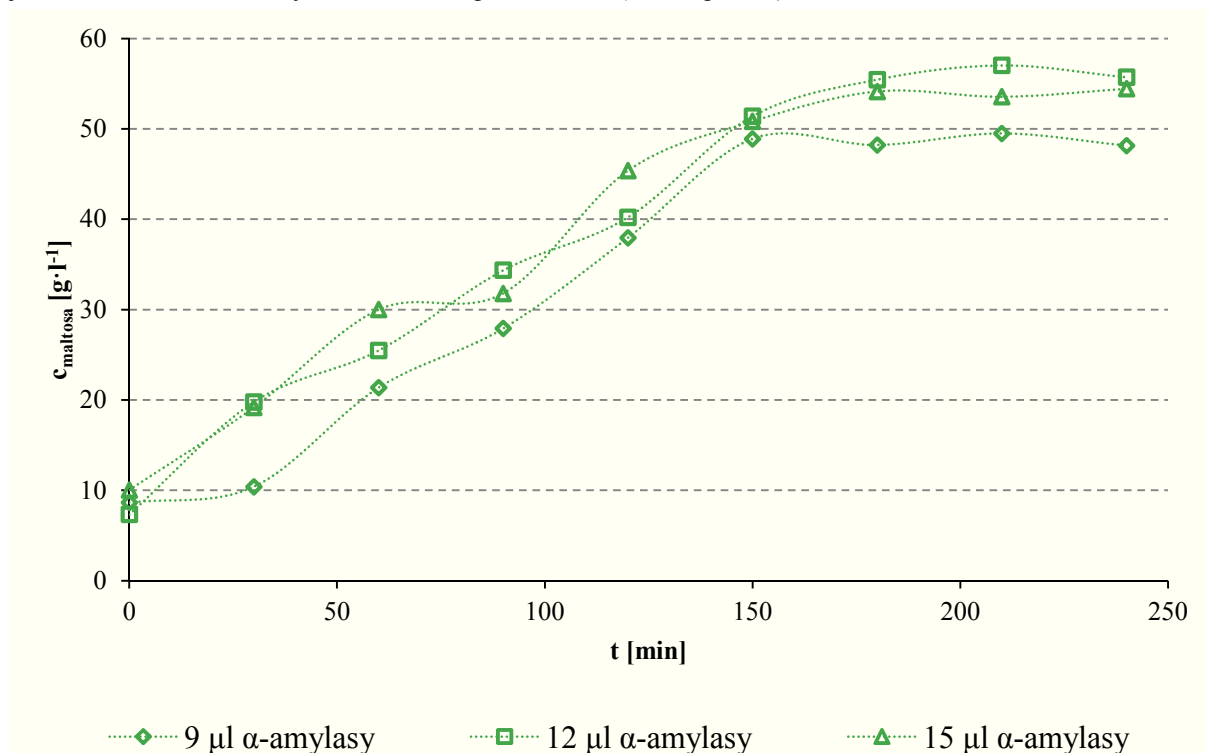
Graf 6 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (80 °C; pH 5,0)



Graf 7 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (80 °C; pH 6,0)



Graf 8 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (80 °C; pH 7,0)



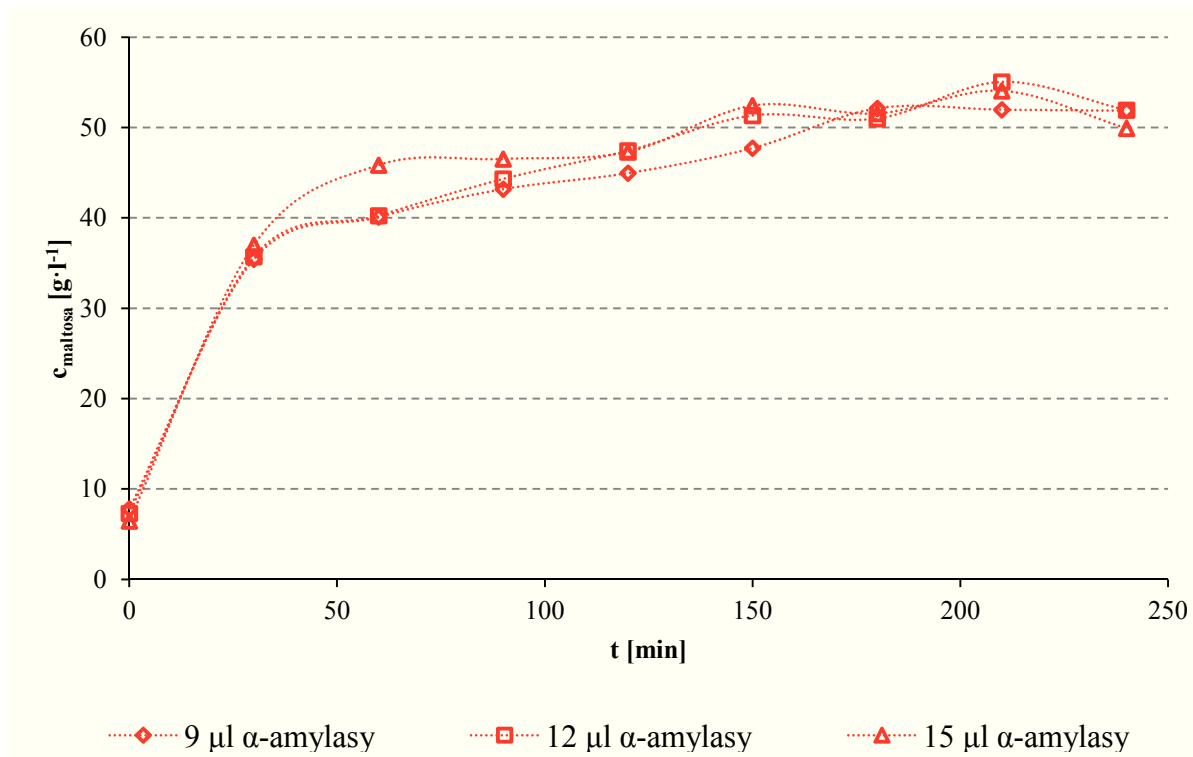
V tabulce 11 jsou shrnuty výsledné koncentrace redukujících cukrů při 80 °C metodou Somogyi-Nelsona s intervaly spolehlivosti. Z důvodů nízkých hodnot intervalů spolehlivosti nebylo možné znázornění v grafech. Z grafů 6 až 8 je patrné, že i při 80 °C je nejvhodnější množství enzymu 12 μl. Při této teplotě je u všech použitých hodnotách pH pozorován konec hydrolýzy škrobu pomocí α-amylasy po 180 minutách. Celkové určení nejvhodnějšího množství enzymu, teploty a pH pro ztekucení je znázorněno v grafech 12 a 13.

Tabulka 12 - Hodnoty koncentrací [g·l⁻¹] vzniklých redukujících cukrů v průběhu ztekucení při teplotě 90 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti

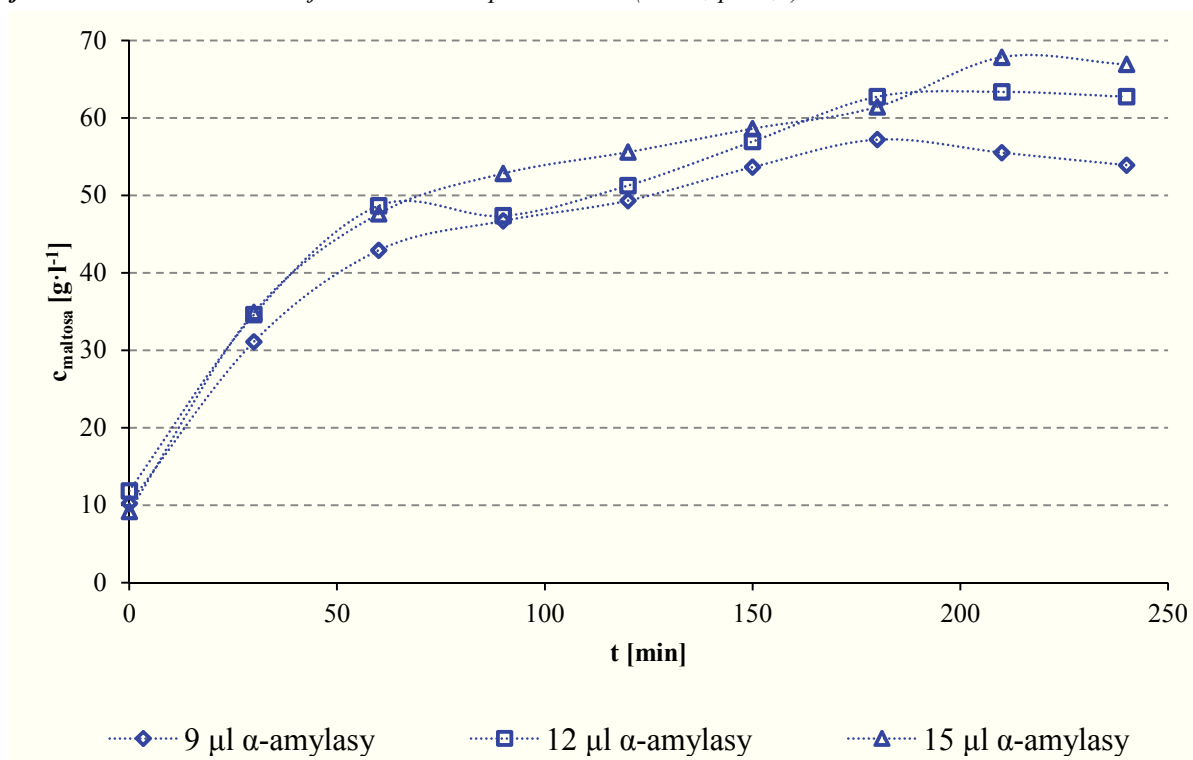
čas [min]	pH 5; 9 μl α-amylasy	pH 5; 12 μl α-amylasy	pH 5; 15 μl α-amylasy
0	7,8 ± 0,3	7,32 ± 0,15	6,454 ± 0,015
30	35 ± 3	35,69 ± 0,14	37 ± 2
60	40,08 ± 0,06	40,24 ± 0,09	45,84 ± 0,06
90	43,18 ± 0,15	44,3 ± 0,9	46,5 ± 0,9
120	44,9 ± 0,9	47 ± 3	47,30 ± 0,13
150	47,7 ± 0,6	51,3 ± 1,3	52,43 ± 0,03
180	52,12 ± 0,06	51 ± 2	51,6 ± 1,1
210	52,0 ± 0,7	55,05 ± 0,13	54,06 ± 0,13
240	52 ± 2	52 ± 3	50 ± 6
čas [min]	pH 6; 9 μl α-amylasy	pH 6; 12 μl α-amylasy	pH 6; 15 μl α-amylasy
0	10,22 ± 0,16	11,84 ± 0,19	9,16 ± 0,02

30	$31,10 \pm 0,08$	35 ± 2	$34,87 \pm 0,03$
60	$42,90 \pm 0,06$	$48,63 \pm 0,09$	$47,6 \pm 0,2$
90	$46,69 \pm 0,06$	$47,35 \pm 0,10$	$52,8 \pm 1,0$
120	$49,3 \pm 1,9$	$51,25 \pm 0,09$	$55,57 \pm 0,09$
150	$53,63 \pm 0,06$	$56,94 \pm 0,03$	$58,6 \pm 0,7$
180	$57,2 \pm 0,8$	$62,7 \pm 0,4$	$61,4 \pm 1,1$
210	$55,5 \pm 1,9$	$63,4 \pm 0,3$	$67,8 \pm 1,5$
240	54 ± 2	$62,72 \pm 0,06$	$66,9 \pm 0,4$
čas [min]	pH 7; 9 μl α-amylasy	pH 7; 12 μl α-amylasy	pH 7; 15 μl α-amylasy
0	$8,979 \pm 0,009$	$12,11 \pm 0,02$	$9,45 \pm 0,08$
30	$37,53 \pm 0,11$	$36,8 \pm 0,9$	$33,98 \pm 0,08$
60	$42,74 \pm 0,15$	49 ± 3	49 ± 3
90	47 ± 2	$57,2 \pm 1,3$	$57,0 \pm 0,4$
120	$50,2 \pm 2,2$	$70,7 \pm 0,4$	58 ± 3
150	$48,48 \pm 0,13$	$71,2 \pm 0,4$	$56,79 \pm 0,13$
180	48 ± 3	$67,3 \pm 1,5$	59 ± 3
210	$46,1 \pm 0,4$	71 ± 4	$59,6 \pm 1,4$
240	$50,8 \pm 0,2$	65 ± 3	58 ± 2

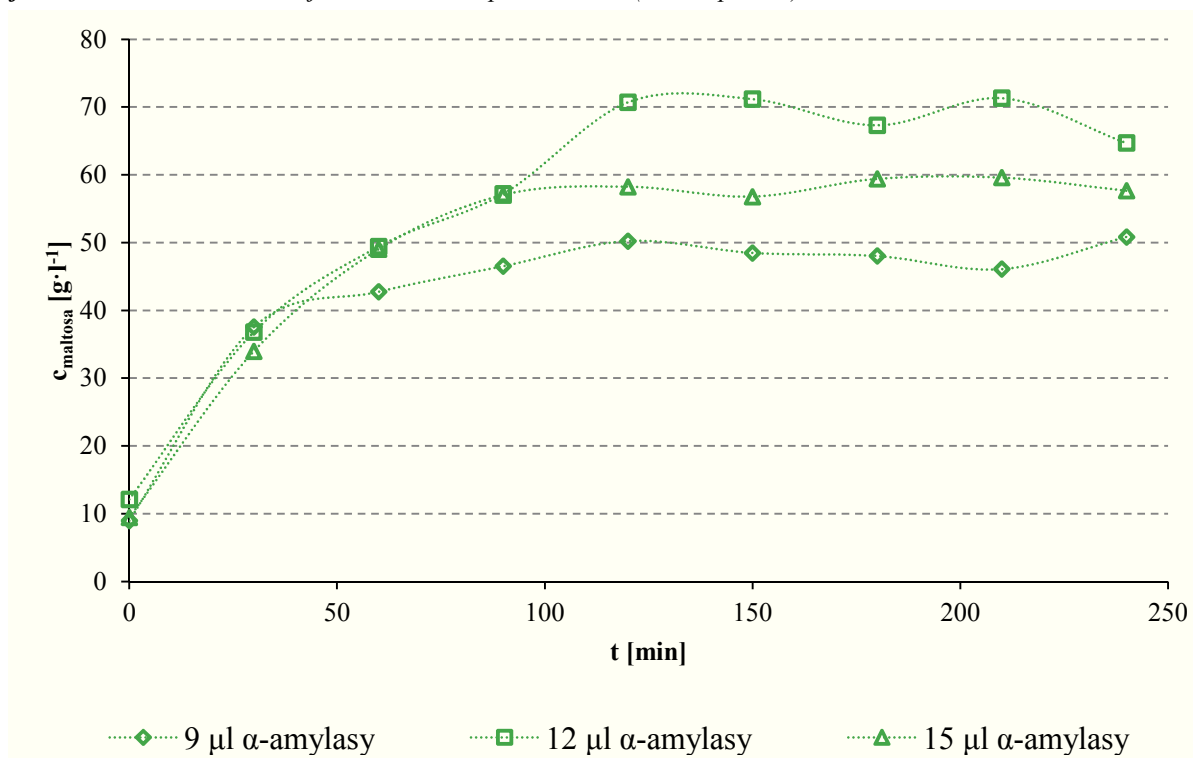
Graf 9 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekučení (90 °C; pH 5,0)



Graf 10 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (90 °C; pH 6,0)



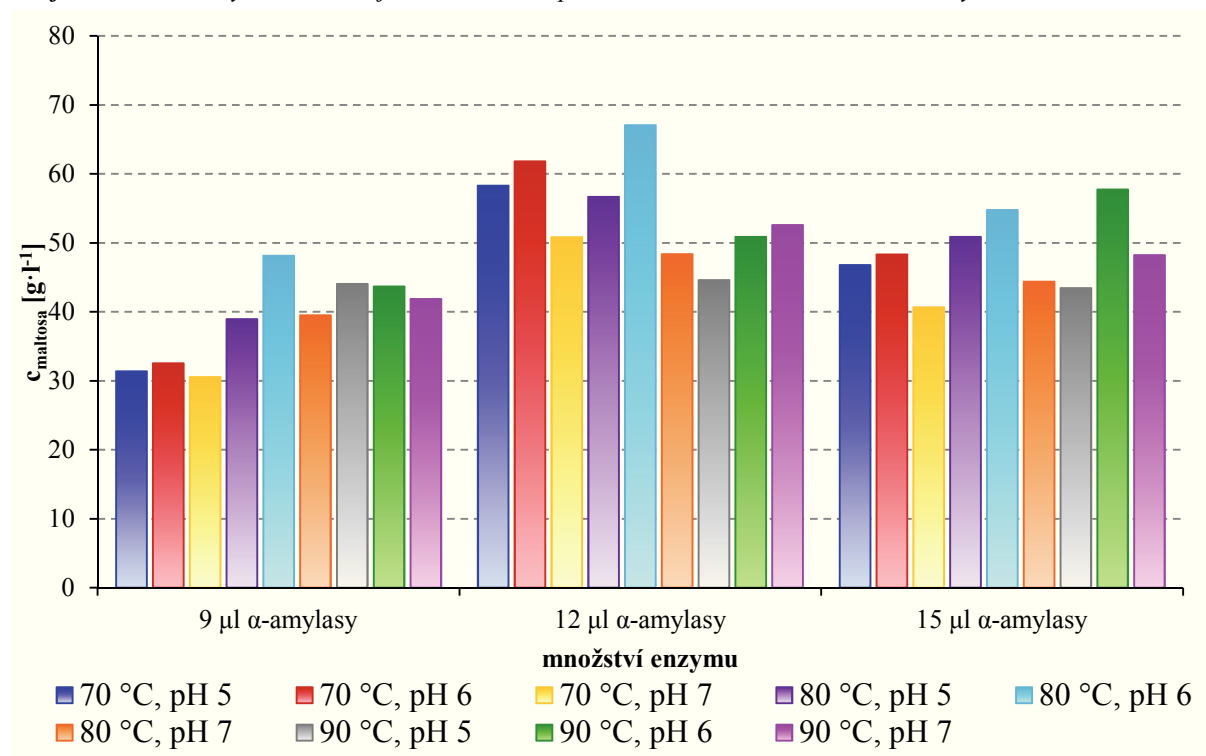
Graf 11 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (90 °C; pH 7,0)



V tabulce 12 jsou uvedeny naměřené hodnoty koncentrací redukujících cukrů při 90 °C metodou Somogyi-Nelsona s intervaly spolehlivosti. I zde nebylo možné použít chybové

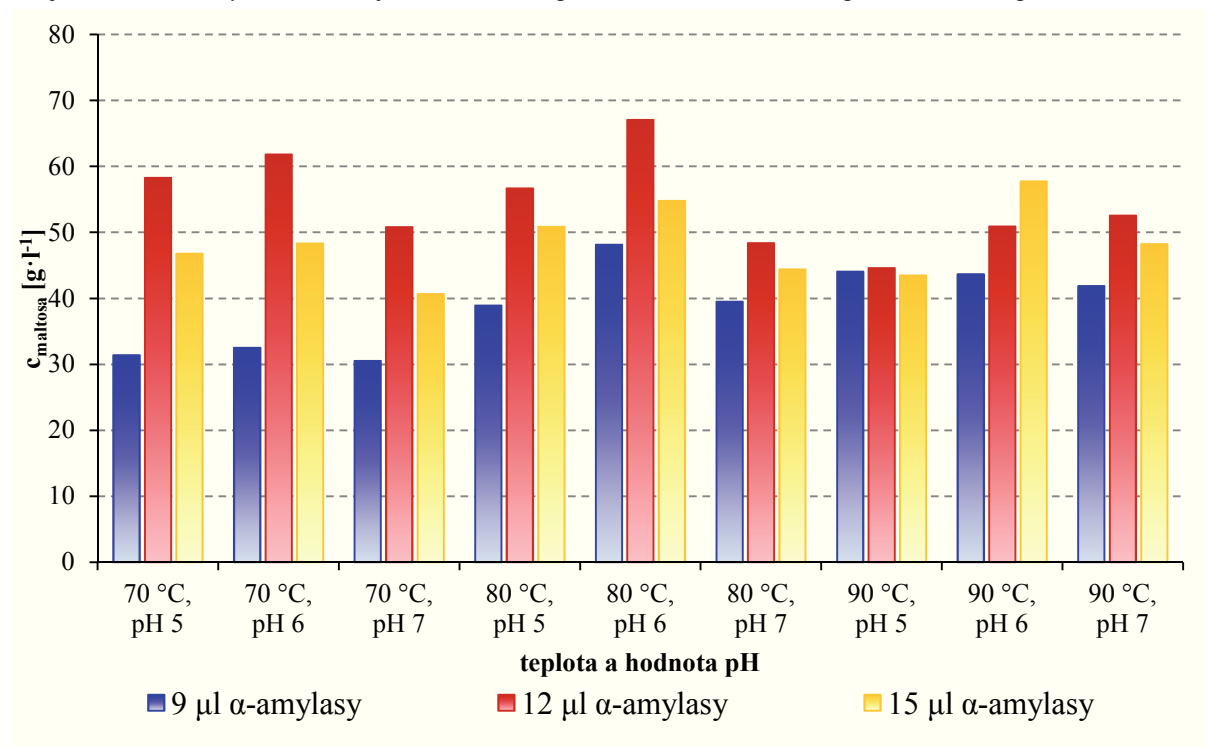
úsečky v grafech, proto jsou hodnoty intervalů spolehlivosti shrnuty do tabulky. Grafy 9 až 11 znázorňují průběhy vzniku redukujících cukrů během ztekucení pomocí α -amylasy. Oproti nižším teplotám je zde zřejmá rychlejší tvorba redukujících sacharidů. Rychlejší vznik může být způsoben díky teplotě, která sama umožňuje štěpení škrobu. U hodnoty pH 5,0 není možné rozhodnout, které množství enzymu je nejvhodnější, redukující cukry vznikaly nejvíce v prvních 60 minutách, poté už došlo jen k nepatrnému zvýšení koncentrace. Při použití pH 6,0 je sice nejvyšší výtěžek na konci při použití 15 μ l enzymu. Výsledná koncentrace není o moc vyšší než při použití 12 μ l enzymu, proto z ekonomického hlediska je dle mého názoru lepší použít toto množství. V tomto případě redukující cukry vznikaly po dobu 180 minut. Pro hodnotu pH 7,0 je potvrzeno jako nejúčinnější množství enzymu 12 μ l a ke štěpení docházelo po dobu 120 minut. Celkové určení nejvhodnějšího množství enzymu, teploty a pH pro ztekucení je znázorněno v grafech 12 a 13.

Graf 12 - Srovnání výtěžku redukujících sacharidů při ztekucení vzhledem k množství enzymu



Hodnoty pro celkové srovnání jednotlivých podmínek ztekucení byly vypočteny jako rozdíl počáteční a konečné koncentrace redukujících sacharidů u jednotlivých vzorků. Graf 12 znázorňuje srovnání celkových výtěžků vzhledem k množství enzymu. Z tohoto grafu je patrné, že při většině podmínek je nejvyšších koncentrací redukujících cukrů dosaženo při použití 12 μ l α -amylasy.

Graf 13 - Srovnání výtěžku redukujících sacharidů při ztekucení vzhledem k teplotě a hodnotě pH



Graf 13 znázorňuje srovnání celkových výtěžků redukujících cukrů při ztekucení za různých koncentrací enzymu vzhledem k teplotě a hodnotě pH. Z tohoto grafu je patrné, že nejvyššího množství redukujících cukrů bylo dosaženo při teplotě 80 °C a hodnotě pH 6. Z toho důvodu byly tyto podmínky považovány jako optimální pro činnost α-amylasy z *B. amyloliquefaciens*.

3.3.2 Sacharifikace

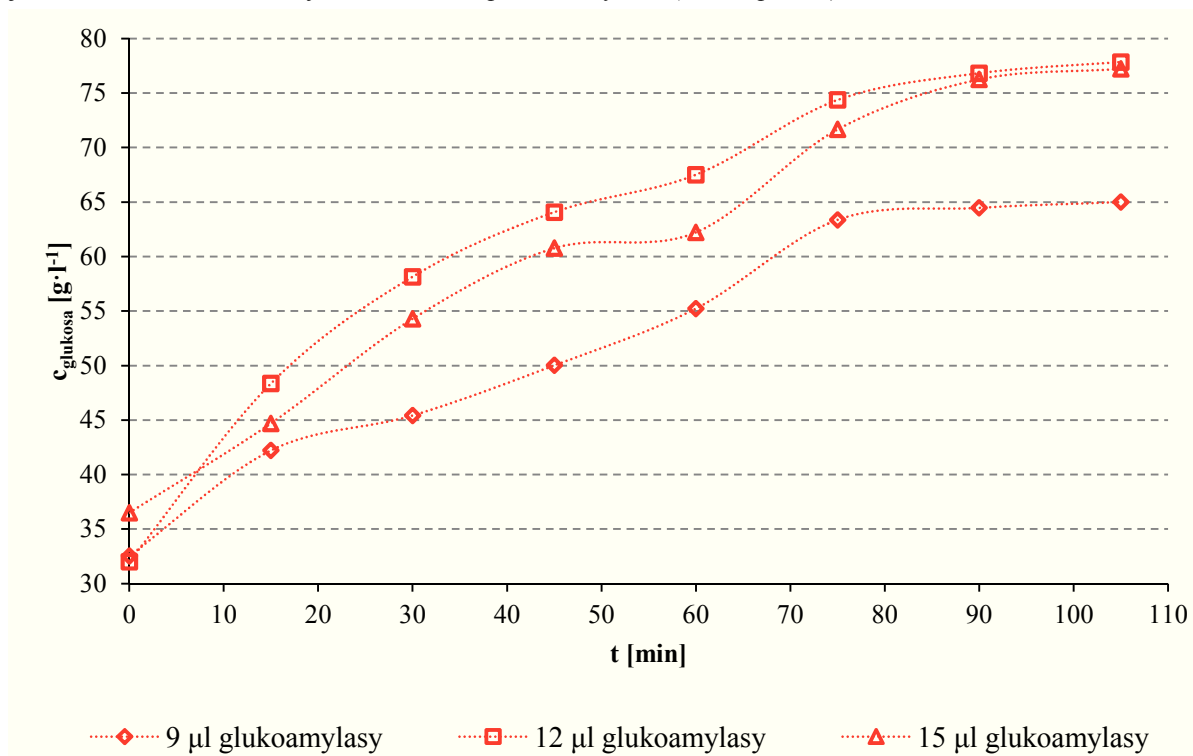
Bylo provedeno zcukření, neboli sacharifikace pomocí glukoamylasy z *A. niger* za podmínek uvedených v kapitole 2.5.2. Pro sledování průběhu enzymatické hydrolýzy glukoamylasou byla použita analýza metodou Somogyi-Nelsona, pomocí které bylo v jednotlivých odběrech během hydrolýzy stanoveno množství redukujících cukrů. Pro přesnější stanovení množství vzniklé glukosy byly počáteční a konečné vzorky analyzovány metodou HPLC. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny v tabulkách 13 až 16 a grafech 14 až 26.

Tabulka 13 - Hodnoty koncentrací [g·l⁻¹] vzniklých redukujících cukrů při teplotě 55 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti (metoda Somogyi-Nelsona)

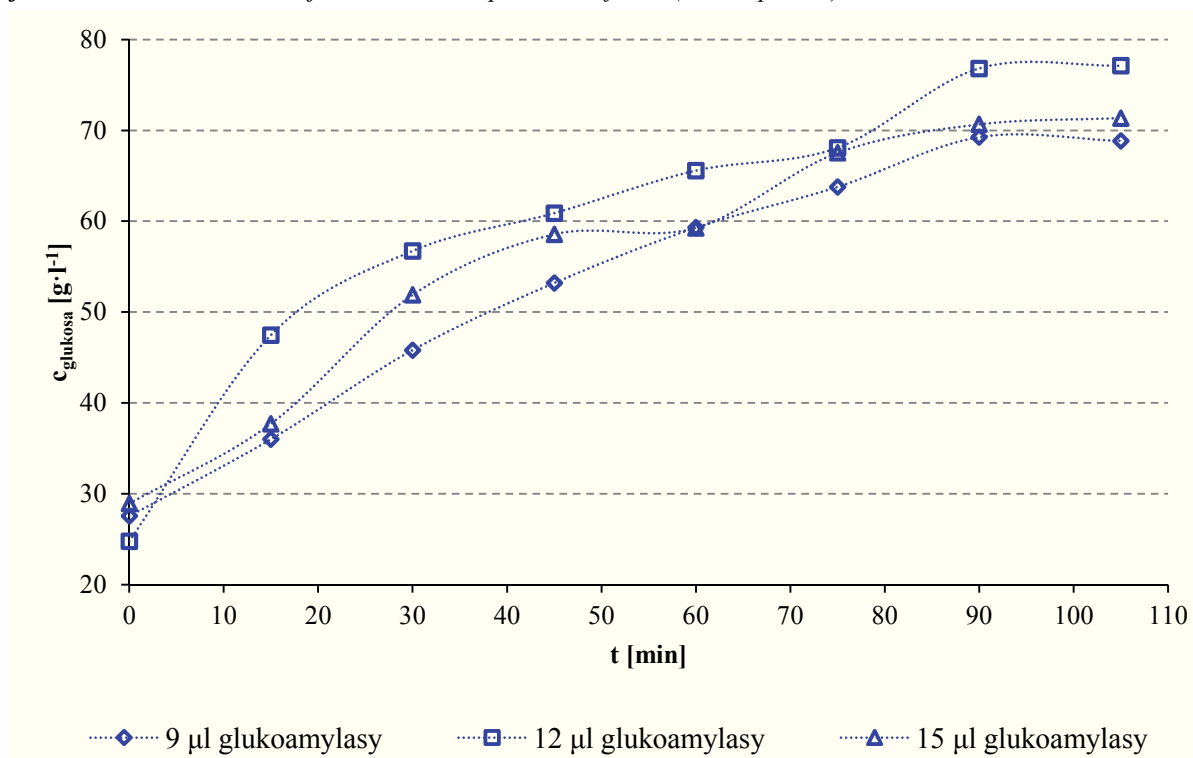
čas [min]	pH 3,2; 9 μl glukoamylasy	pH 3,2; 12 μl glukoamylasy	pH 3,2; 15 μl glukoamylasy
0	32,5 ± 1,2	32 ± 2	36,5 ± 0,8
15	42,21 ± 0,03	48,6 ± 0,2	44,7 ± 0,4
30	45,42 ± 0,06	58,1 ± 0,2	54,3 ± 0,2
45	50,02 ± 0,14	64,1 ± 0,4	61 ± 3
60	55,23 ± 0,11	67,5 ± 0,3	62,21 ± 0,11

75	$63,37 \pm 0,07$	$74,36 \pm 0,14$	$71,7 \pm 0,3$
90	$64,47 \pm 0,11$	$76,8 \pm 0,6$	$76,24 \pm 0,17$
105	$64,99 \pm 0,11$	$77,84 \pm 0,14$	$77,2 \pm 0,2$
čas [min]	pH 4,2; 9 μl glukoamylasy	pH 4,2; 12 μl glukoamylasy	pH 4,2; 15 μl glukoamylasy
0	$27,54 \pm 0,12$	$24,78 \pm 0,10$	$28,92 \pm 0,12$
15	$36,0 \pm 0,5$	$47,47 \pm 0,07$	$37,70 \pm 0,18$
30	$45,8 \pm 0,2$	$56,73 \pm 0,19$	$51,9 \pm 1,7$
45	$53,2 \pm 0,4$	61 ± 4	$58,56 \pm 0,07$
60	$59,3 \pm 0,2$	$65,57 \pm 0,14$	$59,3 \pm 0,3$
75	$63,77 \pm 0,11$	$68,0 \pm 0,2$	$67,52 \pm 0,11$
90	$69,3 \pm 0,3$	$76,8 \pm 0,4$	$70,7 \pm 0,3$
105	$68,9 \pm 0,4$	$77,12 \pm 0,07$	$71,36 \pm 0,14$
čas [min]	pH 5,2; 9 μl glukoamylasy	pH 5,2; 12 μl glukoamylasy	pH 5,2; 15 μl glukoamylasy
0	$28,9 \pm 0,9$	$24,58 \pm 0,07$	$30,0 \pm 0,4$
15	$37,80 \pm 0,18$	$42,0 \pm 0,4$	$38,76 \pm 0,10$
30	$43,0 \pm 0,6$	$48,80 \pm 0,06$	$46,8 \pm 1,1$
45	$55,4 \pm 0,3$	$62,6 \pm 1,0$	$61,64 \pm 0,7$
60	60 ± 3	$66,67 \pm 0,18$	$61,44 \pm 0,17$
75	$64,67 \pm 0,14$	73 ± 3	$65,8 \pm 0,6$
90	65 ± 3	$73,6 \pm 0,5$	$69,75 \pm 0,07$
105	$67,65 \pm 0,14$	$74,16 \pm 0,11$	$70,28 \pm 0,07$

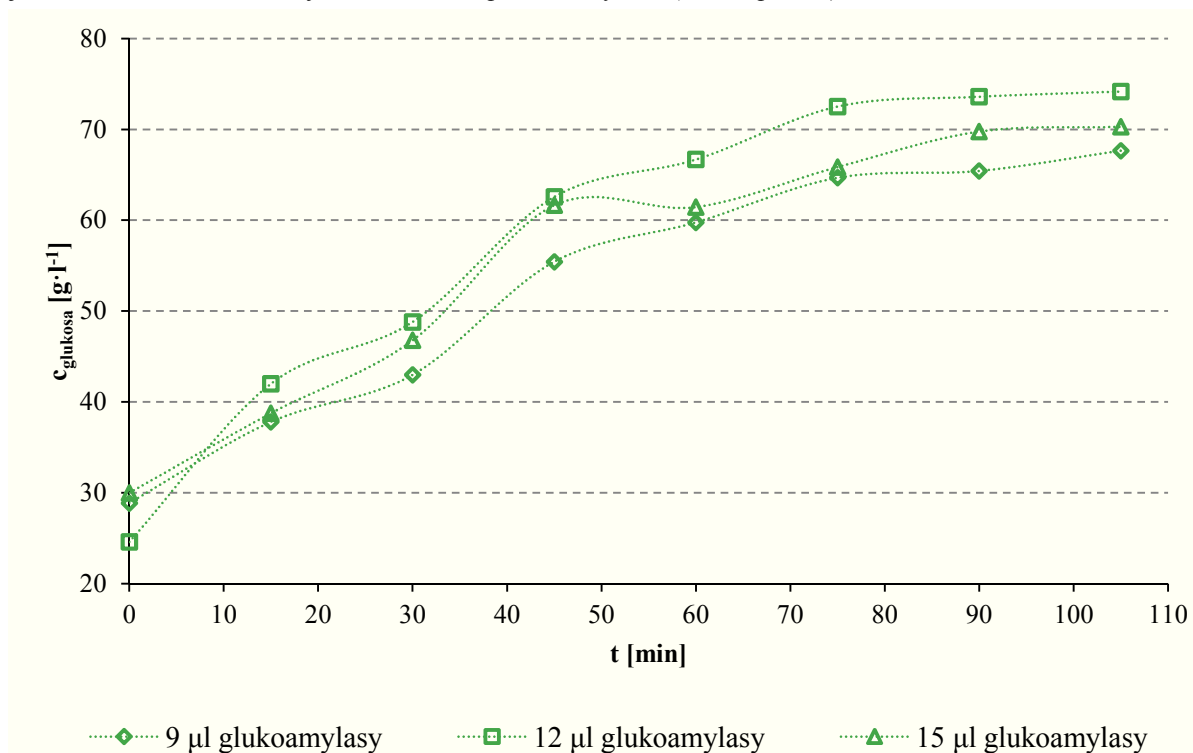
Graf 14 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (55 °C; pH 3,2)



Graf 15 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (55 °C; pH 4,2)



Graf 16 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (55 °C; pH 5,2)



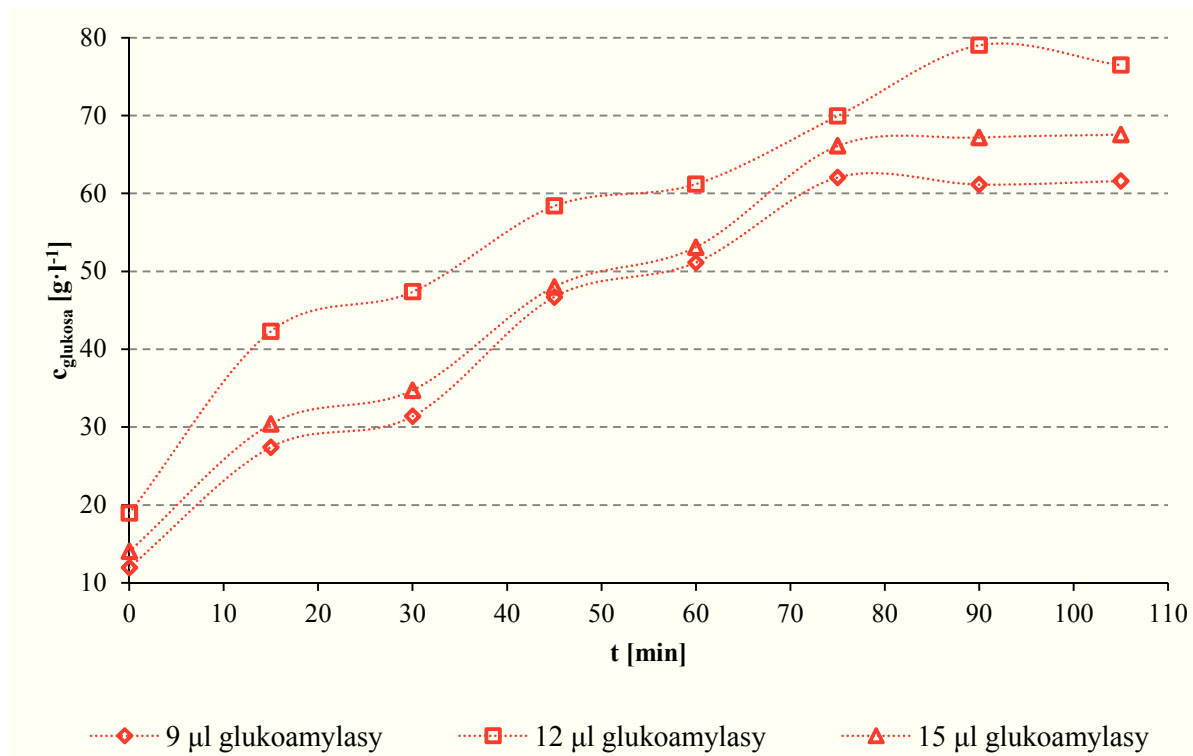
V tabulce 13 jsou uvedeny naměřené hodnoty koncentrací redukujících cukrů vzniklých při sacharifikaci glucoamylasou s intervaly spolehlivosti. Ty nemohly být vyneseny jako chybové úsečky, jelikož jejich hodnoty jsou příliš malé, aby byly zobrazeny v grafech. Uvedené hodnoty jsou pro teplotu 55 °C. Na tabulku navazují grafy 14 až 16, kde jsou znázorněny průběhy sacharifikace za dané teploty a při různém množství enzymu a hodnotě pH. Za různých hodnot pH vzniklo nejvíce glukosy při použití 12 μl enzymu. I když při hodnotě pH 3,2 nebyl téměř žádný rozdíl ve výtěžku při použití 12 a 15 μl enzymu. Z ekonomického hlediska je však vhodnější použití menšího množství enzymu. Skoro ve všech případech je možné sledovat konec hydrolýzy kolem 90. minuty, jen v případě hodnoty pH 5,2 a 12 μl enzymu nastal konec již po 75 minutách.

Tabulka 14 - Hodnoty koncentrací [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$] vzniklých redukujících cukrů při teplotě 60 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti (metoda Somogyi-Nelsona)

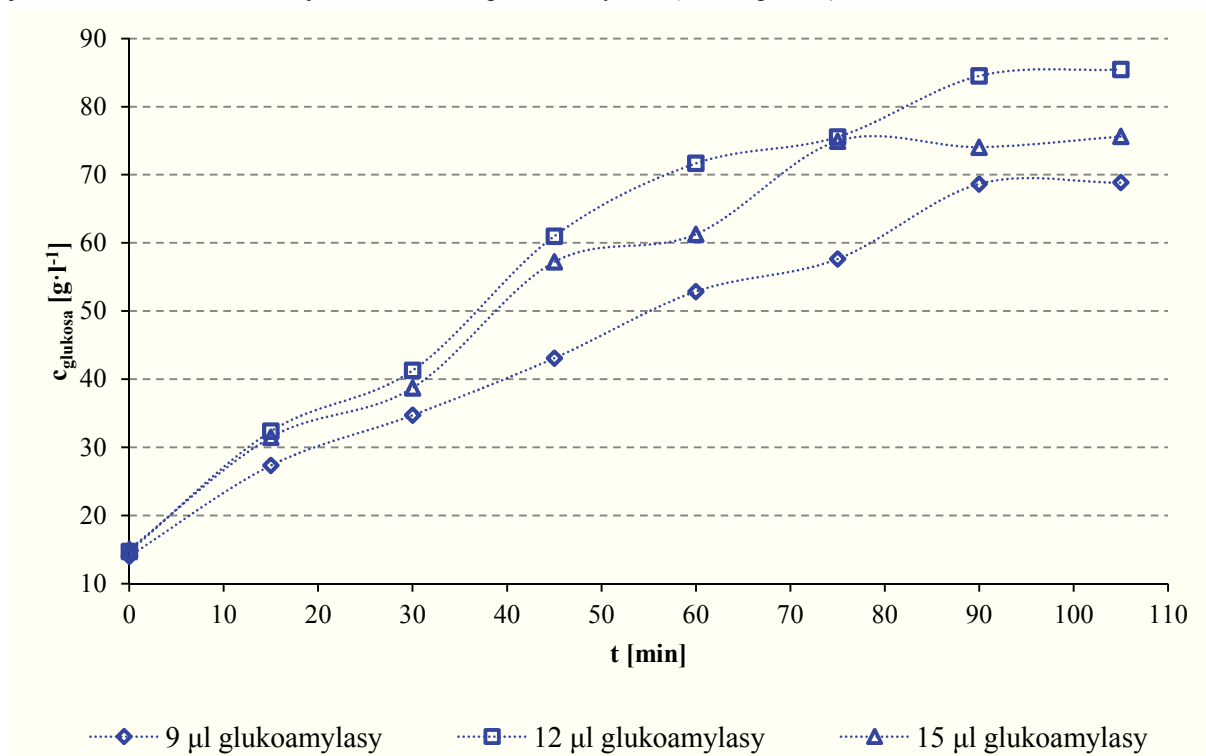
čas [min]	pH 3,2; 9 μl glucoamylasy	pH 3,2; 12 μl glucoamylasy	pH 3,2; 15 μl glucoamylasy
0	11,964 ± 0,013	18,9 ± 0,8	14,026 ± 0,013
15	27,4 ± 0,9	42,3 ± 1,9	30,39 ± 0,03
30	31,37 ± 0,05	47,35 ± 0,12	34,73 ± 0,05
45	46,7 ± 0,4	58,4 ± 0,2	48,0 ± 0,1
60	51,1 ± 1,9	61 ± 2	53,1 ± 1,5
75	62 ± 2	70 ± 3	66,1 ± 0,3
90	61 ± 1	79,0 ± 1,8	67,2 ± 1,8
105	61,6 ± 0,5	76,5 ± 0,7	67,5 ± 0,5

čas [min]	pH 4,2; 9 μ l glukoamylasy	pH 4,2; 12 μ l glukoamylasy	pH 4,2; 15 μ l glukoamylasy
0	14,03 \pm 0,15	14,7 \pm 0,7	15,020 \pm 0,013
15	27,33 \pm 0,10	32,4 \pm 1,0	31,48 \pm 0,12
30	34,71 \pm 0,15	41,28 \pm 0,07	38,7 \pm 0,4
45	43,1 \pm 1,1	61,0 \pm 0,5	57 \pm 3
60	52,9 \pm 0,3	71,7 \pm 0,4	61,3 \pm 0,3
75	57,63 \pm 0,11	75,5 \pm 1,3	74,9 \pm 0,9
90	68,7 \pm 1,1	84,5 \pm 0,8	74,1 \pm 1,2
105	68,9 \pm 0,6	85,5 \pm 0,5	75,6 \pm 0,2
čas [min]	pH 5,2; 9 μ l glukoamylasy	pH 5,2; 12 μ l glukoamylasy	pH 5,2; 15 μ l glukoamylasy
0	16,17 \pm 0,04	15,51 \pm 0,14	12,13 \pm 0,06
15	32,73 \pm 0,05	41 \pm 2	34,7 \pm 0,8
30	37,35 \pm 0,05	48,59 \pm 0,07	39,3 \pm 0,2
45	52,62 \pm 0,17	62,4 \pm 0,5	56,7 \pm 1,5
60	60 \pm 2	66,4 \pm 1,3	62 \pm 2
75	60,5 \pm 0,7	71,36 \pm 0,04	66,9 \pm 1,1
90	64,5 \pm 0,8	74 \pm 3	68,4 \pm 1,8
105	64,8 \pm 0,3	75,4 \pm 0,5	68,8 \pm 1,0

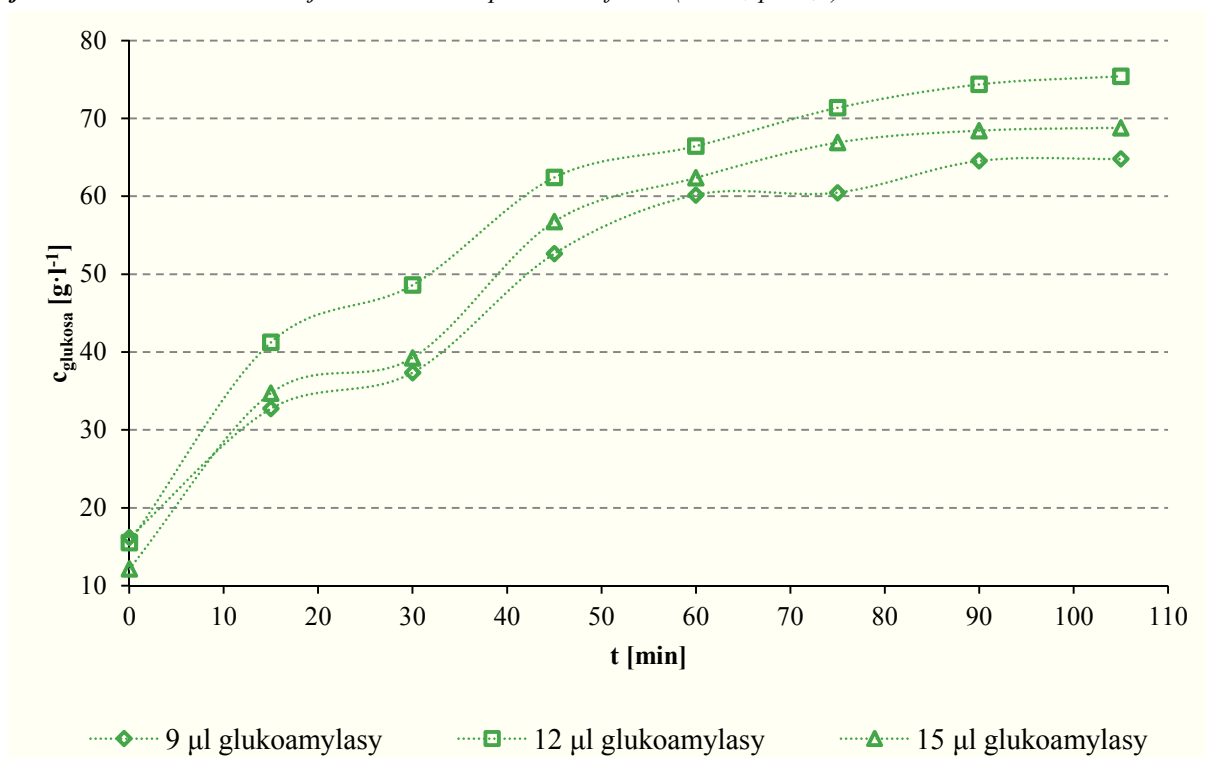
Graf 17 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (60 °C; pH 3,2)



Graf 18 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (60 °C; pH 4,2)



Graf 19 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (60 °C; pH 5,2)



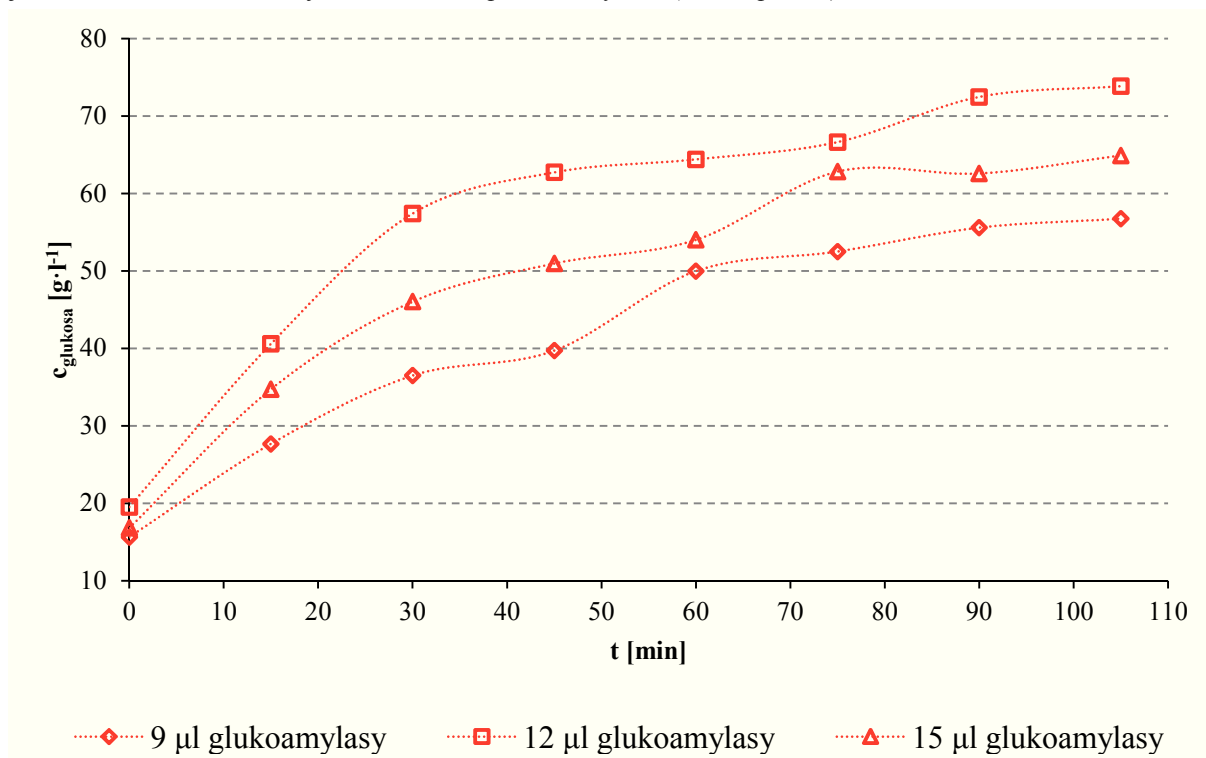
V tabulce 14 jsou shrnuty koncentrace redukujících cukrů vzniklých při sacharifikaci glucoamylasou s intervaly spolehlivosti, které nemohly být z důvodu nízkých hodnot zakresleny do grafu. Uvedené hodnoty jsou pro teplotu 60 °C. Na tabulku navazují grafy 17

až 19, kde jsou znázorněny průběhy sacharifikace za dané teploty a při různém množství enzymu a hodnotě pH. Z grafů je patrné, že nejúčinnější bylo za všech podmínek opět použití 12 µl glukoamylasy. Při všech zvolených podmínkách bylo štěpení ukončeno kolem 90. minuty. Výjimku však tvořila množství enzymu 9 a 15 µl při pH 3,2, kde se redukující cukry přestaly tvořit již po 75 minutách.

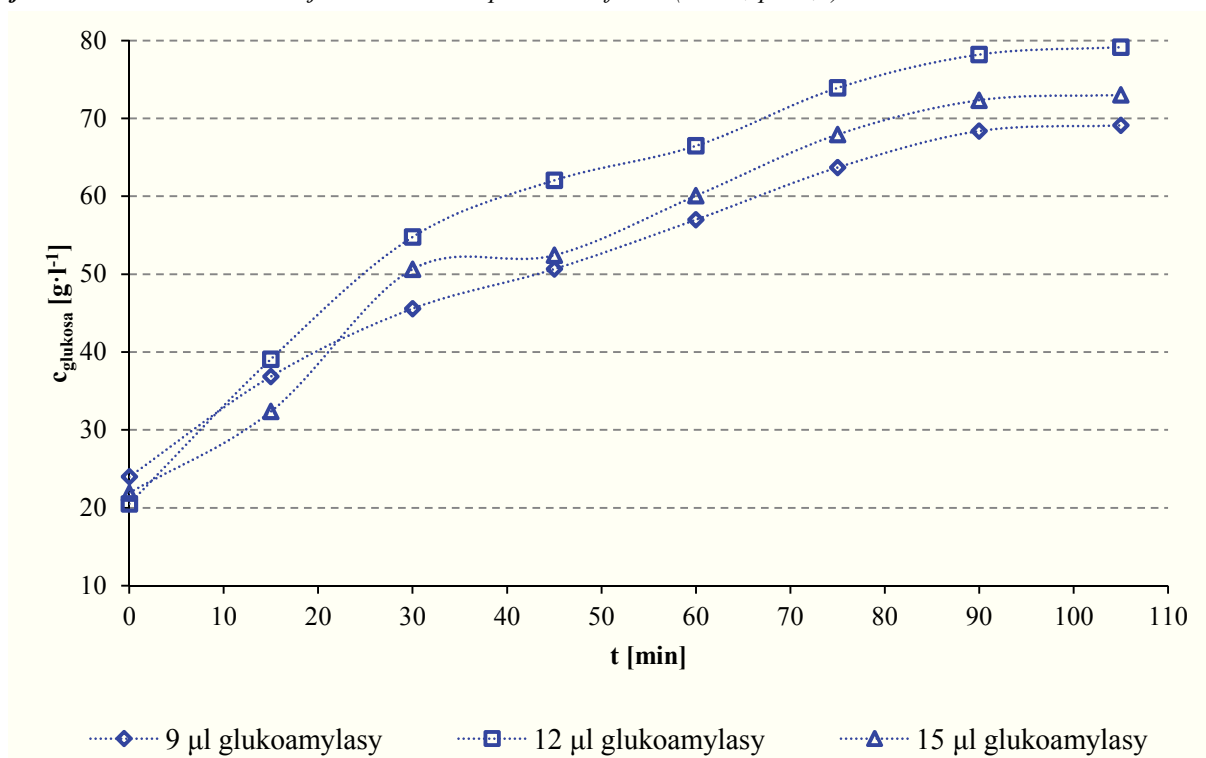
Tabulka 15 - Hodnoty koncentrací [g·l⁻¹] vzniklých redukujících cukrů při teplotě 65 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti

čas [min]	pH 3,2; 9 µl glukoamylasy	pH 3,2; 12 µl glukoamylasy	pH 3,2; 15 µl glukoamylasy
0	15,63 ± 0,07	19,5 ± 1,9	16,81 ± 0,16
15	27,7 ± 0,2	40,58 ± 0,12	34,7 ± 0,7
30	36,48 ± 0,03	57 ± 3	46 ± 3
45	40 ± 3	63 ± 2	50,9 ± 0,4
60	50 ± 3	64 ± 6	54,00 ± 0,04
75	52,5 ± 0,3	67 ± 8	63 ± 2
90	55,58 ± 0,04	72,46 ± 0,18	62,6 ± 1,3
105	56,7 ± 0,5	73,8 ± 0,5	64,9 ± 0,3
čas [min]	pH 4,2; 9 µl glukoamylasy	pH 4,2; 12 µl glukoamylasy	pH 4,2; 15 µl glukoamylasy
0	24 ± 2	20,50 ± 0,11	21,9 ± 0,8
15	36,85 ± 0,10	39 ± 3	32,36 ± 0,15
30	45,56 ± 0,03	54,8 ± 0,3	50,63 ± 0,12
45	50,64 ± 0,04	62,0 ± 0,6	52,42 ± 0,08
60	56,98 ± 0,07	66,47 ± 0,04	60,06 ± 0,07
75	63,69 ± 0,04	73,9 ± 0,8	67,9 ± 0,2
90	68,4 ± 0,2	78,2 ± 0,2	72,33 ± 0,14
105	69,1 ± 0,3	79,14 ± 0,14	73,01 ± 0,04
čas [min]	pH 5,2; 9 µl glukoamylasy	pH 5,2; 12 µl glukoamylasy	pH 5,2; 15 µl glukoamylasy
0	15,43 ± 0,04	22,8 ± 1,7	20,7 ± 0,9
15	32,06 ± 0,07	44,1 ± 0,2	35,3 ± 0,2
30	43,3 ± 1,8	55,29 ± 0,15	44,8 ± 1,8
45	46,89 ± 0,04	57,1 ± 0,8	50,22 ± 0,07
60	51,80 ± 0,14	67,2 ± 0,5	60,36 ± 0,18
75	55,73 ± 0,14	72,0 ± 0,2	64,4 ± 0,2
90	59,7 ± 0,3	76,01 ± 0,04	69,25 ± 0,04
105	59,5 ± 0,8	77,12 ± 0,07	70,35 ± 0,07

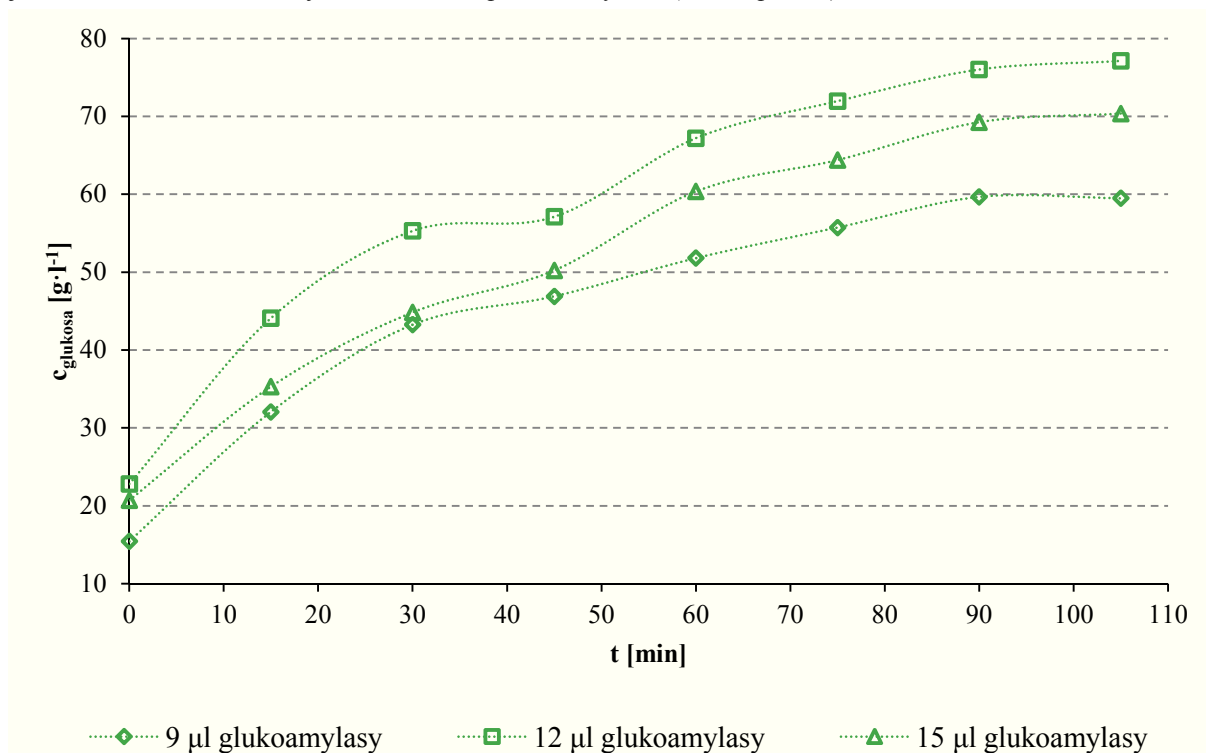
Graf 20 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (65 °C; pH 3,2)



Graf 21 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (65 °C; pH 4,2)

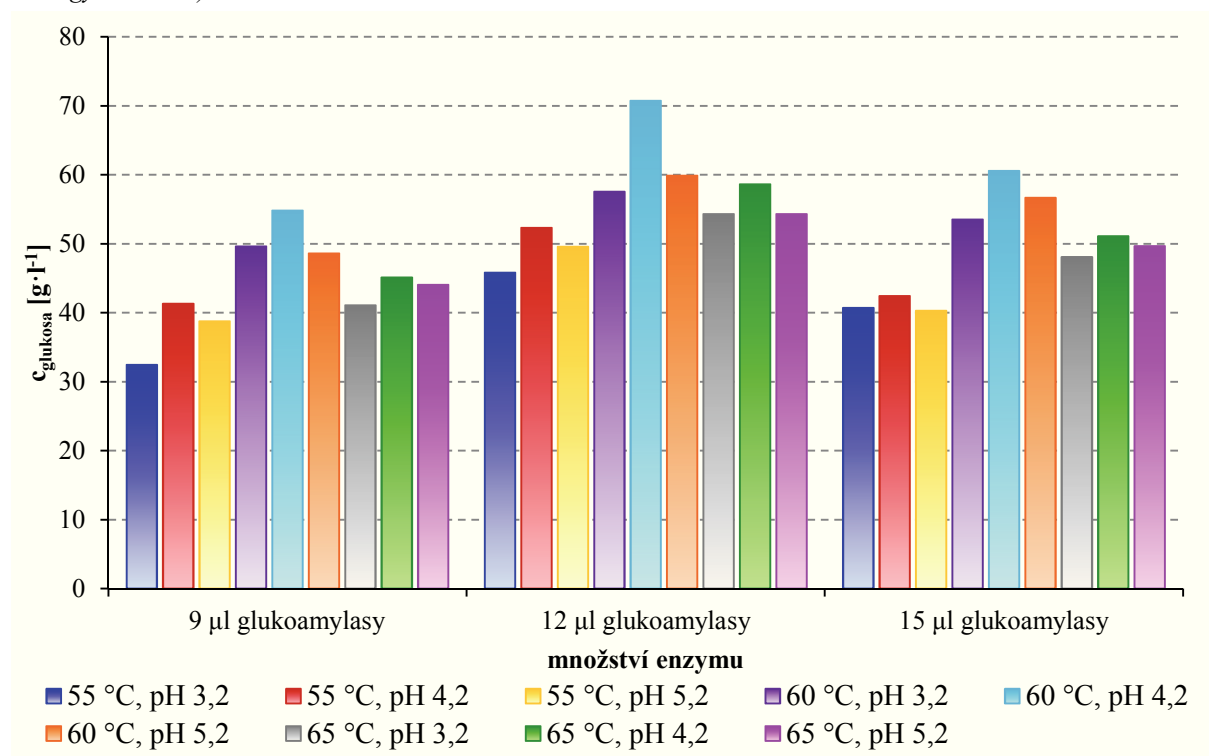


Graf 22 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (65 °C; pH 5,2)



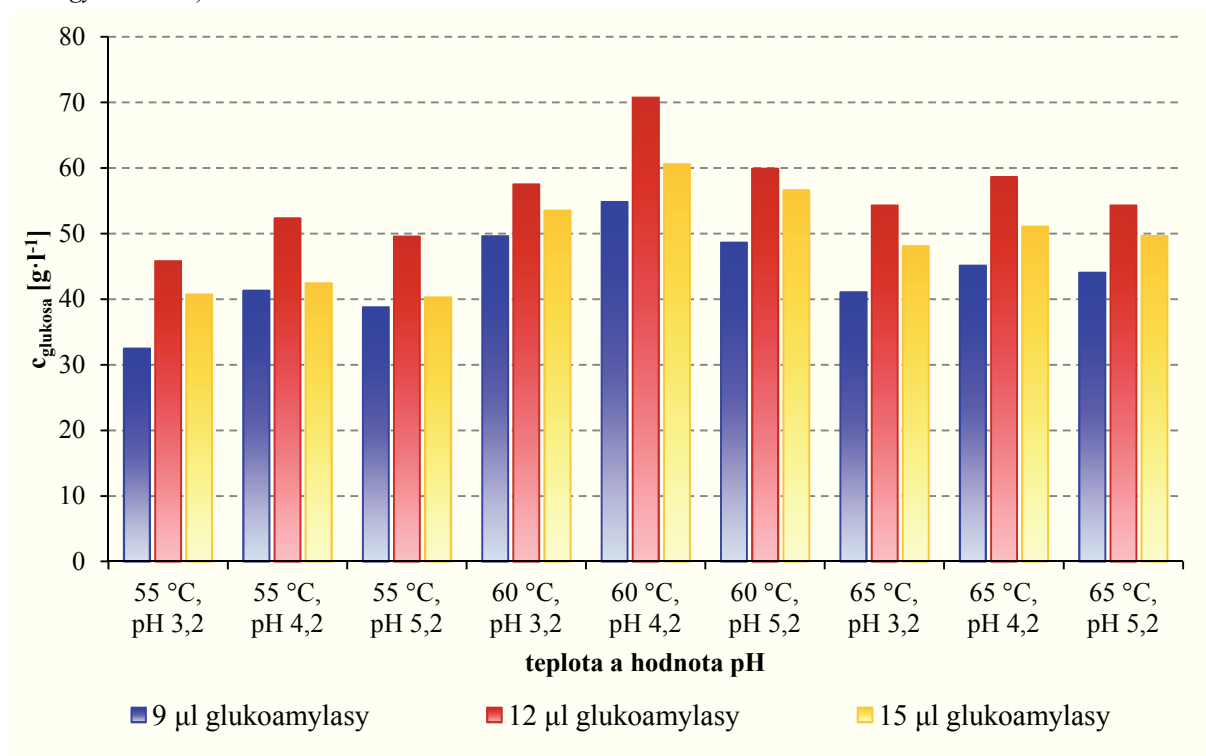
Tabulka 15 a grafy 20 až 22 zobrazují výsledné koncentrace redukujících cukrů vzniklé při sacharifikaci glucoamylasou při teplotě 65 °C. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty a intervaly spolehlivosti. Navazující grafy znázorňují jednotlivé průběhy. I při této teplotě vyšlo množství 12 μl glucoamylasy jako neoptimálnější. Za všech podmínek vznikaly redukující cukry po dobu 90 minut. Jedinou výjimkou byla podmínka, při které byla použita hodnota pH 3,2 a 15 μl enzymu. Zde byl konec pozorován již po 75 minutách.

Graf 23 - Srovnání výtěžku redukujících sacharidů při sacharifikaci vzhledem k množství enzymu (metoda Somogyi-Nelsona)



Graf 23 znázorňuje srovnání celkových výtěžků vzhledem k množství enzymu. Hodnoty pro celkové srovnání jednotlivých podmínek sacharifikace byly vypočteny jako rozdíl počáteční a konečné koncentrace redukujících sacharidů jednotlivých vzorků. Z grafu je patrné, že u všech uvedených podmínek bylo dosaženo nejvyšších koncentrací redukujících cukrů použitím 12 μl glukoamylasy.

Graf 24 - Srovnání výtěžku redukujících sacharidů při sacharifikaci vzhledem k teplotě a hodnotě pH (metoda Somogyi-Nelsona)



Graf 24 znázorňuje srovnání celkových výtěžků redukujících cukrů při sacharifikaci za různých koncentrací enzymu vzhledem k teplotě a hodnotě pH. Je patrné, že největší množství redukujících cukrů vzniklo při teplotě 60 °C a hodnotě pH 4,2. Lze tedy usoudit, že tyto podmínky jsou optimální pro činnost glucoamylasy z *A. niger*.

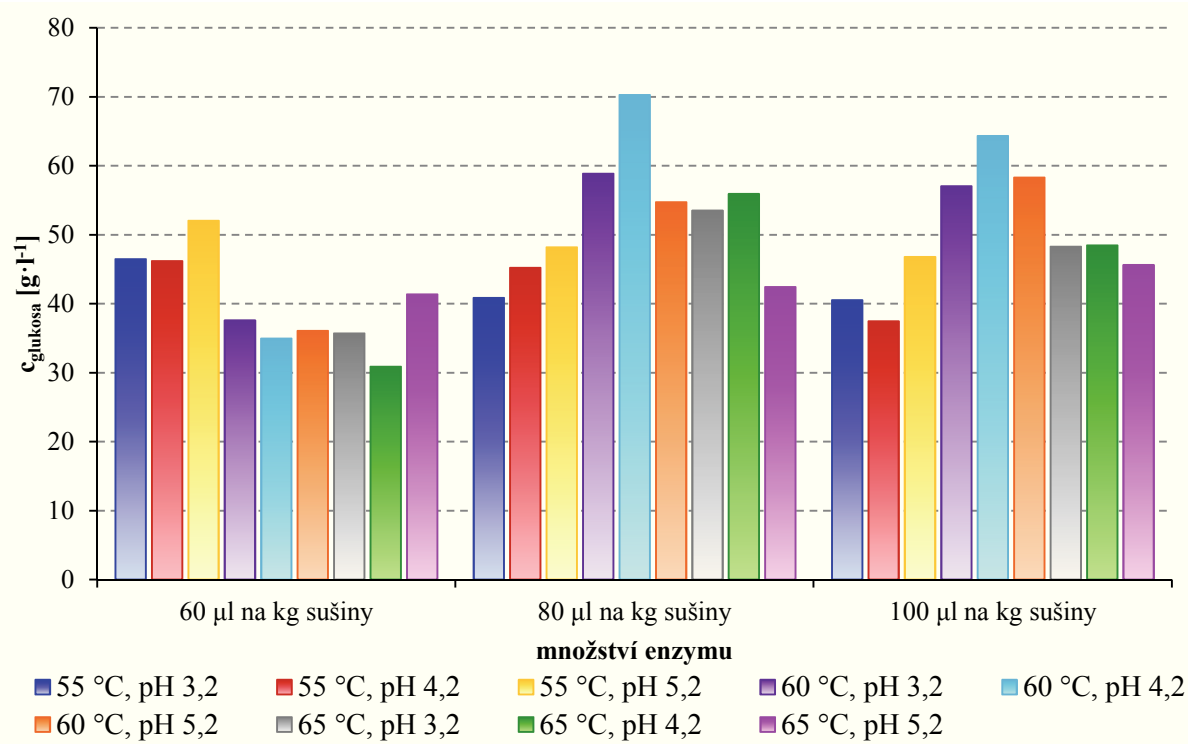
Tabulka 16 - Hodnoty koncentrací [g·l⁻¹] vzniklé glukosy při sacharifikaci s intervaly spolehlivosti zjištěné metodou HPLC

55 °C			
čas [min]	pH 3,2; 9 μl glucoamylasy	pH 3,2; 12 μl glucoamylasy	pH 3,2; 15 μl glucoamylasy
0	41,73 ± 0,11	64,6 ± 0,4	70,0 ± 0,3
105	88,2 ± 1,0	105,4 ± 0,8	110,6 ± 1,2
čas [min]	pH 4,2; 9 μl glucoamylasy	pH 4,2; 12 μl glucoamylasy	pH 4,2; 15 μl glucoamylasy
0	50,90 ± 0,13	57,4 ± 0,3	65,92 ± 0,06
105	97 ± 2	102,6 ± 0,7	103,4 ± 0,9
čas [min]	pH 5,2; 9 μl glucoamylasy	pH 5,2; 12 μl glucoamylasy	pH 5,2; 15 μl glucoamylasy
0	38,1 ± 0,2	53,4 ± 0,4	42,9 ± 0,3
105	90 ± 2	101,6 ± 0,3	89,7 ± 0,3
60 °C			
čas [min]	pH 3,2; 9 μl glucoamylasy	pH 3,2; 12 μl glucoamylasy	pH 3,2; 15 μl glucoamylasy

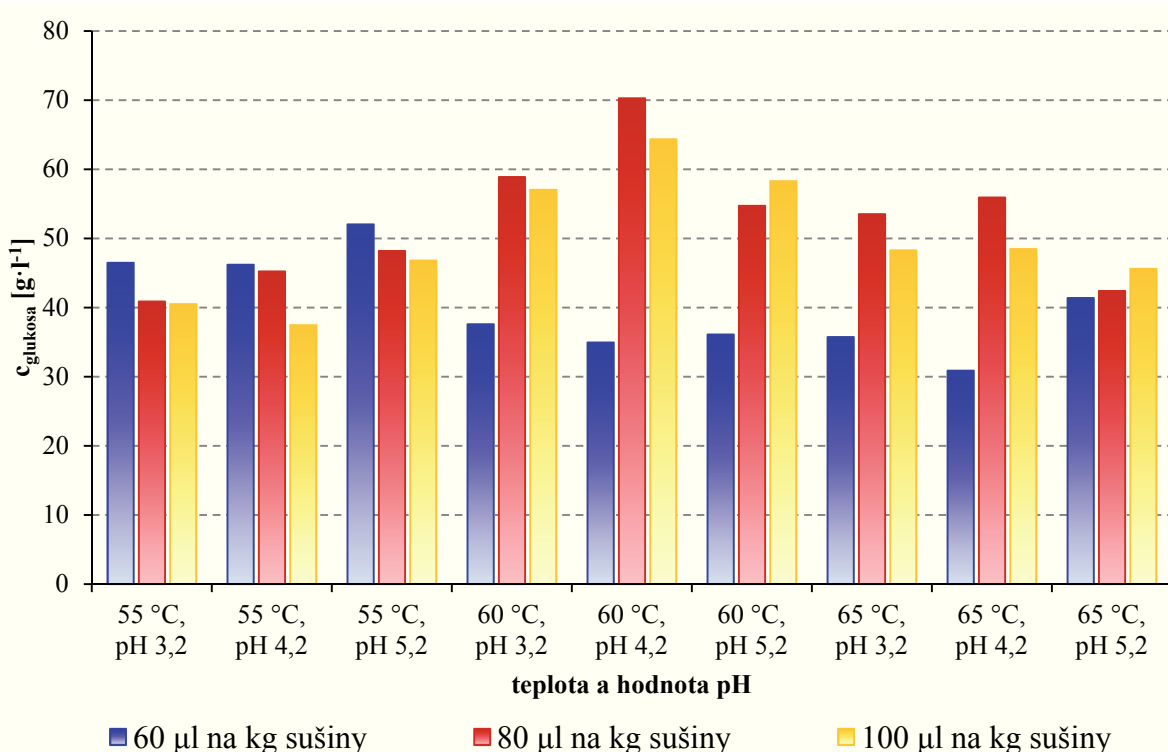
0	68,66 ± 0,04	42,9 ± 0,2	46,1 ± 0,3
105	106,2 ± 0,5	101,8 ± 0,8	103,1 ± 0,3
čas [min]	pH 4,2; 9 µl glukoamylasy	pH 4,2; 12 µl glukoamylasy	pH 4,2; 15 µl glukoamylasy
0	56,52 ± 0,07	35,59 ± 0,07	41,1 ± 0,2
105	91,5 ± 0,8	105,9 ± 1,8	105,4 ± 0,8
čas [min]	pH 5,2; 9 µl glukoamylasy	pH 5,2; 12 µl glukoamylasy	pH 5,2; 15 µl glukoamylasy
0	56,75 ± 0,12	43,9 ± 0,7	39,2 ± 0,3
105	92,8 ± 0,5	98,6 ± 0,6	97,4 ± 0,6
65 °C			
čas [min]	pH 3,2; 9 µl glukoamylasy	pH 3,2; 12 µl glukoamylasy	pH 3,2; 15 µl glukoamylasy
0	58,9 ± 0,6	47,9 ± 0,3	40,42 ± 0,09
105	94,6 ± 1,0	101,4 ± 0,9	88,7 ± 0,2
čas [min]	pH 4,2; 9 µl glukoamylasy	pH 4,2; 12 µl glukoamylasy	pH 4,2; 15 µl glukoamylasy
0	69,0 ± 0,6	45,1 ± 0,7	48,6 ± 0,8
105	99,9 ± 0,2	101,0 ± 0,4	97 ± 2
čas [min]	pH 5,2; 9 µl glukoamylasy	pH 5,2; 12 µl glukoamylasy	pH 5,2; 15 µl glukoamylasy
0	53,1 ± 0,6	58,2 ± 0,3	57,0 ± 0,7
105	94,5 ± 1,2	101 ± 3	102,6 ± 0,9

Pro přesnější stanovení koncentrace glukosy vzniklé enzymatickou hydrolýzou byla stanovena koncentrace glukosy v počátečních a konečných vzorcích metodou HPLC. Výhodou této metody je stanovení koncentrace pouze glukosy, která je hlavním produktem hydrolýzy. Výsledky byly shrnuty do tabulky 16 včetně intervalů spolehlivosti. Pro názornější srovnání jednotlivých hydrolýz za různých podmínek byly sestaveny sloupcové grafy 25 a 26.

Graf 25 - Srovnání výtěžku glukosy při sacharifikaci vzhledem k množství enzymu (metoda HPLC)



Graf 26 - Srovnání výtěžku glukosy při sacharifikaci vzhledem k teplotě a hodnotě pH (metoda HPLC)



V grafech 25 a 26 jsou shrnuty výsledky stanovené metodou HPLC. Optimální podmínky stanovené metodou HPLC se shodují s výsledky stanovenými spektrofotometrickou metodou podle Somogyi-Nelsona, která ovšem při stanovení není schopna rozlišit jednotlivé redukující cukry. Navíc při spektrofotometrických stanoveních redukujících cukrů v biologických vzorcích mohou vznikat interference endogenní glukosou. [72]

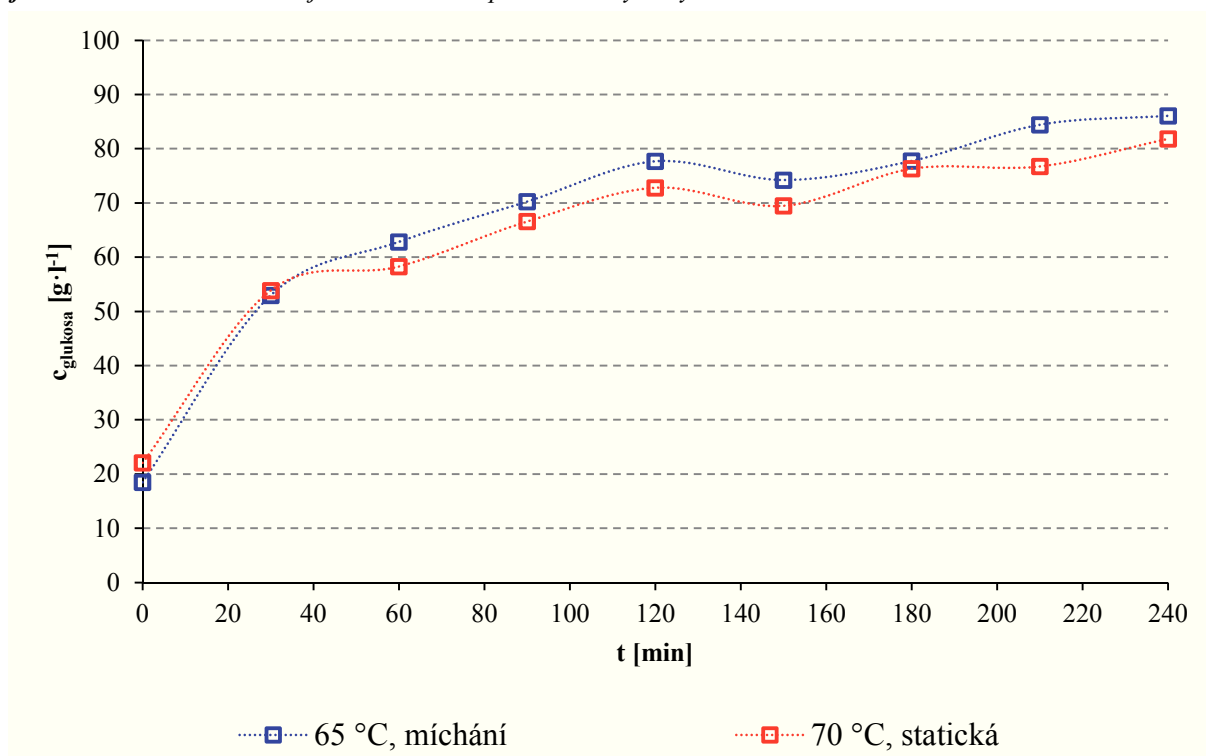
3.3.3 Kombinovaná hydrolýza

Kombinovaná hydrolýza byla provedena dvěma způsoby, a to současným přidáním obou enzymů (směsná 1) nebo postupným přidáním α -amylasy a glukoamylasy (směsná 2). Postupy jednotlivých metod jsou podrobně uvedeny v kapitole 2.5.3. Výsledky obou způsobů jsou shrnuty v tabulkách 17 až 20 a grafech 27 až 31.

Tabulka 17 - Naměřené hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ redukujících cukrů s intervaly spolehlivosti při směsné hydrolýze 1

čas [min]	65 °C, míchání	70 °C, statická
0	18,483 \pm 20,916	22,07 \pm 0,05
30	53,0 \pm 59,9	53,9 \pm 0,6
60	62,84 \pm 71,11	58,3 \pm 0,5
90	70,3 \pm 79,5	66,6 \pm 0,2
120	77,7 \pm 87,9	73 \pm 5
150	74,2 \pm 84,0	69,5 \pm 1,0
180	77,74 \pm 87,97	76 \pm 2
210	84,43 \pm 95,54	76,7 \pm 0,8
240	86,08 \pm 97,41	81,8 \pm 0,6

Graf 27 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při směsné hydrolýze 1



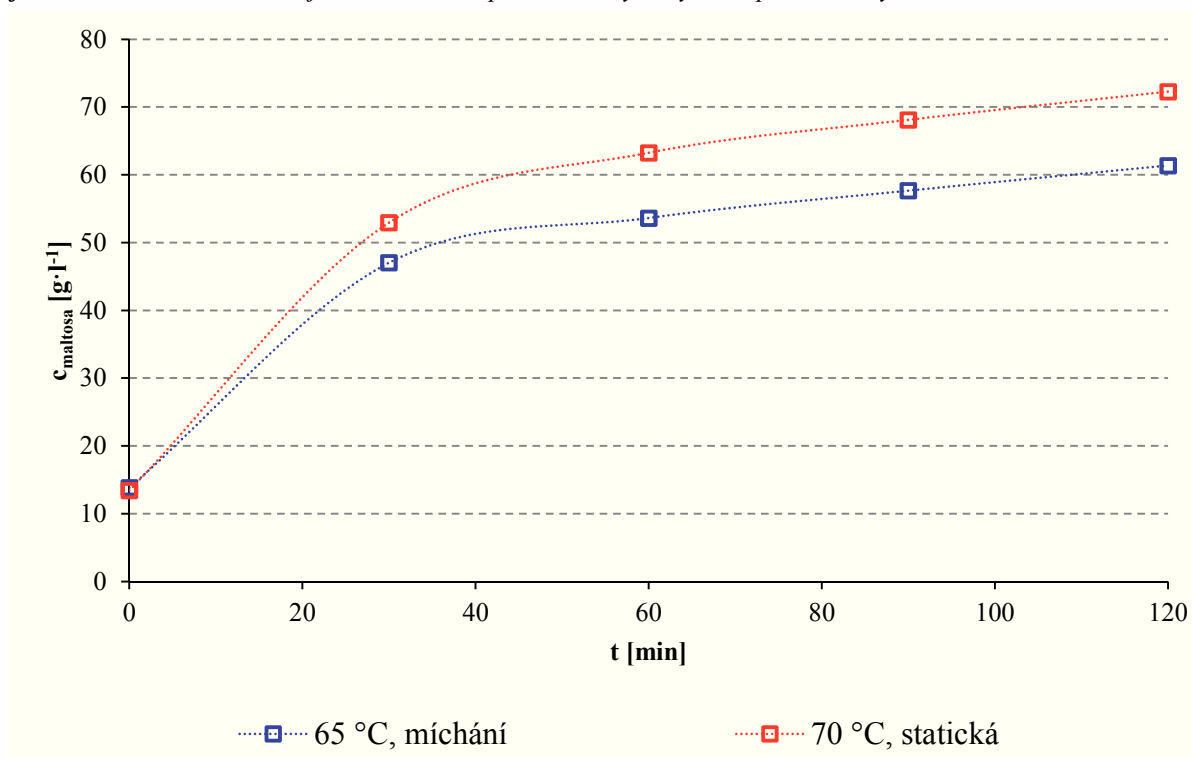
Z grafu 27 lze usuzovat, že při směsné hydrolýze 1 byly výhodnější podmínky při teplotě 65 °C a míchání. Rozdíl mezi hydrolýzou při 70 °C bez míchání a 65 °C s mícháním však není velký. Naměřené hodnoty koncentrací redukujících cukrů včetně intervalů spolehlivosti jsou uvedeny v tabulce 17. Z grafu lze dále usuzovat, že kombinovaná hydrolýza 1 se začala

ustalovat mezi 220. a 240. minutou, proto byla ukončena. Všechny vzorky byly stanoveny metodou Somogyi-Nelson a koncentrace byly vypočteny pomocí kalibrační křivky glukosy (viz příloha). V tabulce 17 jsou uvedeny naměřené hodnoty s intervaly spolehlivosti, které nemohly být dány do grafu jako chybové úsečky, jelikož byly příliš malé.

Tabulka 18 - Naměřené hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ redukujících cukrů s intervaly spolehlivosti při směsné hydrolyze 2 - pouze α -amylasa

čas [min]	65 °C, míchání	70 °C, statická
0	$13,82 \pm 0,08$	$13,421 \pm 0,017$
30	$47,02 \pm 0,05$	$52,95 \pm 0,15$
60	$53,63 \pm 0,06$	63 ± 7
90	$57,7 \pm 0,5$	$68,1 \pm 0,3$
120	61 ± 5	$72,28 \pm 0,12$

Graf 28 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při směsné hydrolyze 2 - pouze α -amylasa

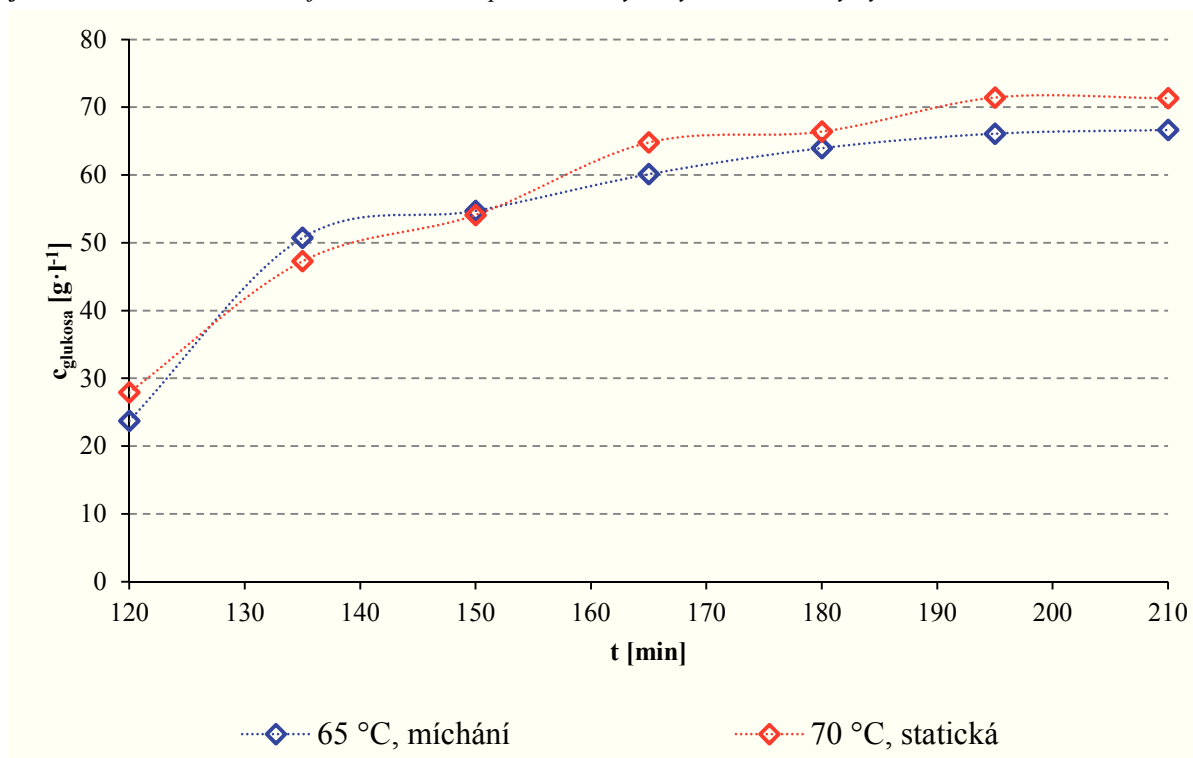


Tabulka 19 - Naměřené hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ redukujících cukrů s intervaly spolehlivosti při směsné hydrolyze 2 - oba enzymy

čas [min]	65 °C, míchání	70 °C, statická
120	$23,7 \pm 1,9$	$27,91 \pm 0,05$
135	$50,73 \pm 0,10$	$47,27 \pm 0,10$
150	$54,70 \pm 0,07$	$54,10 \pm 0,09$
165	$60,1 \pm 0,6$	65 ± 2

180	$63,97 \pm 0,07$	66 ± 3
195	$66,10 \pm 0,04$	$71,43 \pm 0,04$
210	$66,6 \pm 0,3$	71 ± 3

Graf 29 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při směsné hydrolýze 2 - oba enzymy

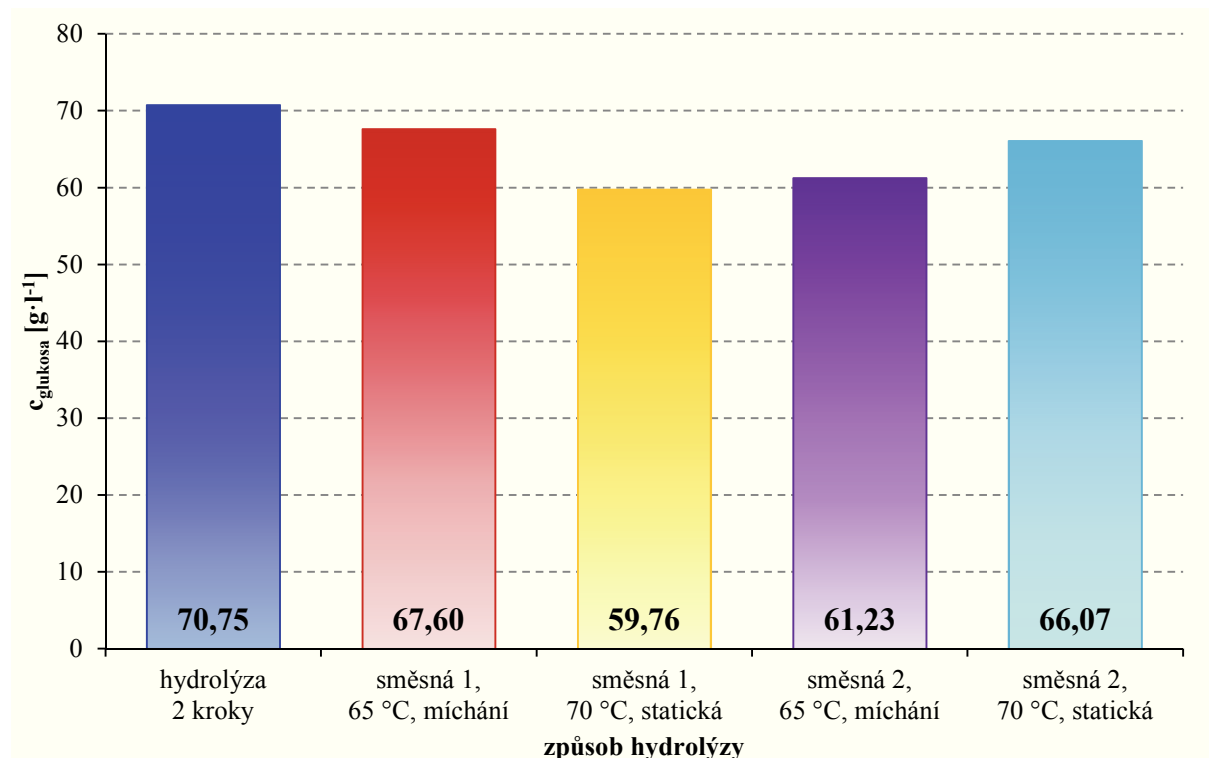


V tabulkách 18 a 19 jsou uvedeny naměřené hodnoty koncentrací redukujících cukrů vznikajících během směsné hydrolýzy 2, včetně intervalů spolehlivosti. V grafu 28 je znázorněno působení α -amylasy během počátečních 2 hodin, poté byla přidána glukoamylasa, jejíž následné působení je znázorněno v grafu 29. Průběh směsné hydrolýzy 2 je rozdělen do dvou grafů, protože u metody Somogyi-Nelson je nutno použít různé kalibrační křivky pro výpočet redukujících cukrů. Působením α -amylasy vzniká jako hlavní produkt maltosa, zatímco působením glukoamylasy vzniká jako hlavní produkt glukosa. Kalibrační křivky jsou v příloze.

Z grafu 28 je patrné, že se ztekucení začalo ustalovat během 90. a 120. minuty, proto po 120. minutách byla přidána glukoamylasa. Dále je z grafu patrné, že pro působení α -amylasy byla výhodnější podmínkou teplota 70 °C bez míchání. Interval spolehlivosti byly příliš malé, aby mohly být znázorněny jako chybové úsečky v grafu, proto jsou uvedeny v tabulkách 18 a 19.

Graf 29 znázorňuje následné působení glukoamylasy, která byla přidána do substrátu po 120 minutách působení α -amylasy. Z grafu je patrné, že tvorba glukosy se ustalovala po 195. minutě. Dále je patrné, že při 70 °C bez míchání vzniklo více glukosy. Srovnání konečných výtěžků redukujících sacharidů obou metod směsné hydrolýzy stanovených metodou Somogyi-Nelsona bylo shrnuto do grafu 30.

Graf 30 - Srovnání výtěžku redukujících sacharidů při různých způsobech hydrolýzy (metoda Somogyi-Nelsona)

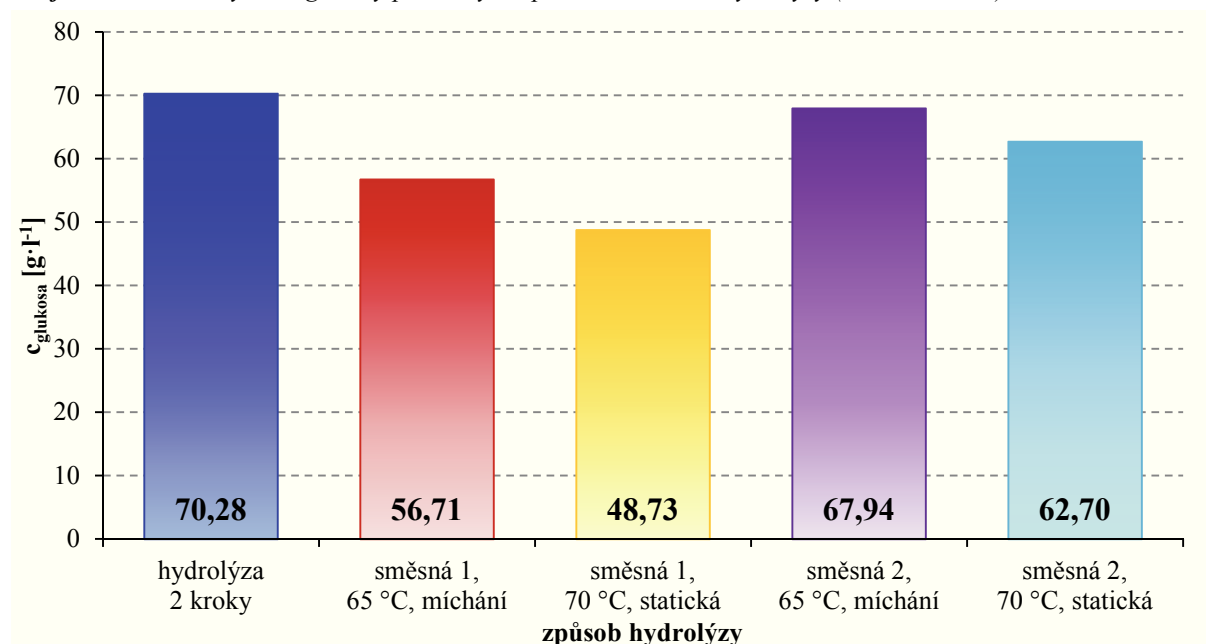


Graf 30 znázorňuje srovnání konečných koncentrací redukujících sacharidů vzniklých při různých způsobech hydrolýzy. V tomto grafu jsou srovnány hodnoty získané metodou Somogyi-Nelsona, získané odečtením počáteční a konečné koncentrace redukujících cukrů. Je patrné, že nejvíce redukujících cukrů vzniklo během 2 krokové hydrolýzy, kdy probíhalo čtyřhodinové ztekucení α -amylasou a následně byla přidána glukoamylasa. Druhou nejvýhodnější metodou byla směsná hydrolýza 1 při 65 °C s mícháním. Pro stanovení přesné koncentrace glukosy byly počáteční a konečné vzorky podrobeny i analýze metodou HPLC, která určila přesné množství a stanovila glukosu mezi jinými redukujícími cukry.

Tabulka 20 - Naměřené hodnoty koncentrací $[\text{g} \cdot \text{l}^{-1}]$ redukujících cukrů s intervaly spolehlivosti při obou způsobech hydrolýzy (metoda HPLC)

	směsná 1, 65 °C, míchání	směsná 1, 70 °C, statická	směsná 2, 65 °C, míchání	směsná 2, 70 °C, statická
začátek	50,9 ± 0,3	51,5 ± 0,2	31,69 ± 0,13	32,8 ± 0,4
konec	108 ± 1	100 ± 3	99,6 ± 0,7	95 ± 4

Graf 31 - Srovnání výtěžku glukosy při různých způsobech směsné hydrolýzy (metoda HPLC)



V grafu 31 je uvedeno srovnání množství vzniklé glukosy při různých způsobech směsné hydrolýzy stanovené metodou HPLC. Tato množství byla vypočtena z rozdílu stanovených koncentrací v počátečním a konečném vzorku. Stejně jako u analýzy metodou Somogyi-Nelsona vychází nejvíce glukosy u dvou krokové hydrolýzy. Další výsledky se však liší. Druhý nejvyšší výtěžek byl u směsné hydrolýzy 2 za 65 °C s mícháním, která i byla vybrána jako nejvhodnější způsob hydrolýzy před fermentací. Hlavním důvodem je to, že dvou kroková hydrolýza je ekonomicky náročnější, jelikož probíhala skoro dvojnásobnou dobu, co hydrolýza směsná. Navíc muselo být upravováno pH pro první a druhý enzym zvlášť a hydrolyzovaná suspenze chleba mezi aplikací jednotlivých enzymů byla zchlazována. Mimo jiné se pro tento způsob hydrolýzy musel použít termostat a temperovaná třepačka, kde byly nastaveny dvě různé teploty, čímž se také zvýšila ekonomická náročnost této metody. Směsná hydrolýza 2 obnášela pouze úpravu pH na počátku hydrolýzy a celá byla prováděna pouze na temperované třepačce. Hodnoty koncentrací s intervaly spolehlivosti jsou uvedeny v tabulce 20.

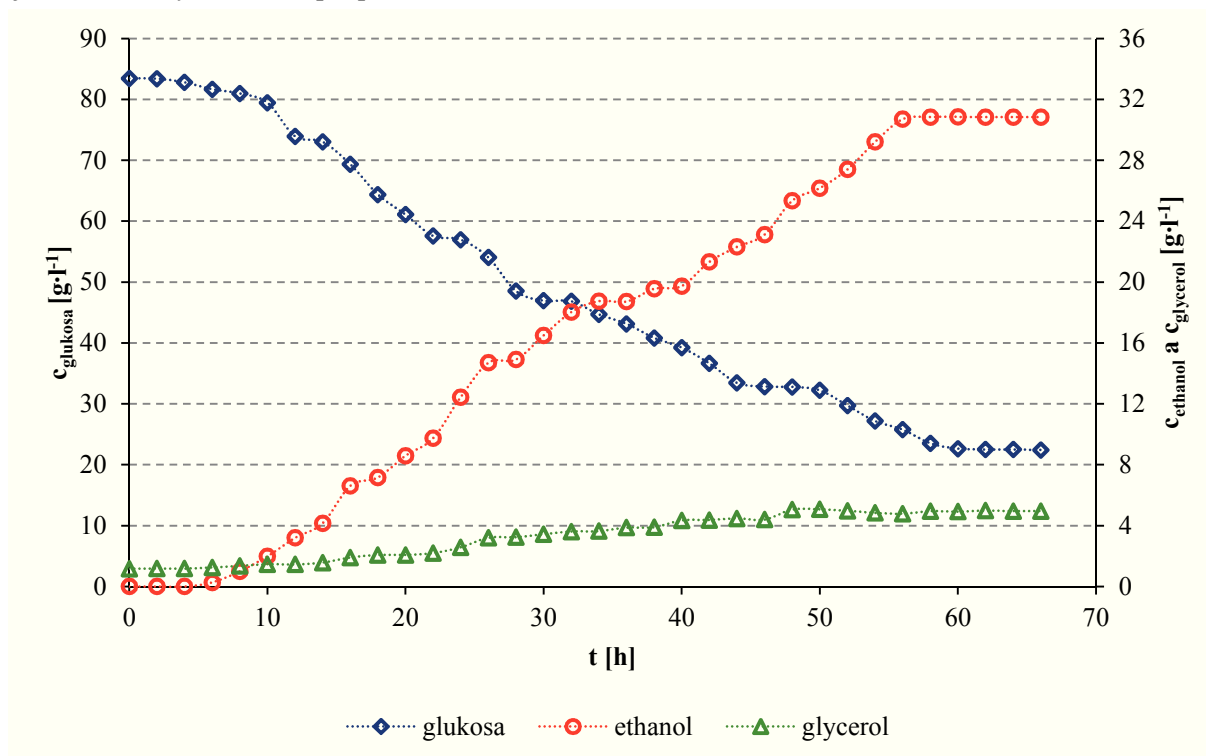
3.4 Fermentace

Fermentace byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 2.6. V jednotlivých vzorcích odebraných během fermentace byl stanoven obsah glukosy, ethanolu a glycerolu metodou HPLC. Koncentrace byly vypočítány podle kalibračních křivek uvedených v příloze.

Tabulka 21 - Naměřené hodnoty koncentrací glukosy, ethanolu a glycerolu během fermentace s pH 5

čas [h]	c _{glukosa} [g·l ⁻¹]	c _{ethanol} [g·l ⁻¹]	c _{glycerol} [g·l ⁻¹]
0	83,4 ± 0,8	-	1,17 ± 0,06
2	83,4 ± 0,3	-	1,19 ± 0,04
4	82,81 ± 0,19	-	1,18 ± 0,06
6	81,67 ± 0,02	0,27 ± 0,03	1,25 ± 0,02
8	81,0 ± 0,3	1,00 ± 0,12	1,36 ± 0,06
10	79,46 ± 0,17	1,98 ± 0,06	1,47 ± 0,04
12	73,94 ± 0,02	3,20 ± 0,04	1,45 ± 0,06
14	73,03 ± 0,5	4,16 ± 0,08	1,57 ± 0,03
16	69,3 ± 0,7	6,61 ± 0,15	1,90 ± 0,06
18	64,4 ± 0,3	7,16 ± 0,09	2,08 ± 0,10
20	61,1 ± 1,1	8,60 ± 0,17	2,079 ± 0,011
22	57,6 ± 0,8	9,74 ± 0,10	2,20 ± 0,04
24	57,0 ± 0,3	12,44 ± 0,03	2,58 ± 0,19
26	54,0 ± 0,5	14,8 ± 0,3	3,203 ± 0,016
28	48,511 ± 0,002	14,91 ± 0,07	3,2 ± 0,2
30	46,95 ± 0,09	16,495 ± 0,011	3,4 ± 0,2
32	46,8 ± 0,7	18,02 ± 0,04	3,61 ± 0,05
34	44,69 ± 0,02	18,7 ± 0,5	3,64 ± 0,11
36	43,1 ± 0,2	18,7 ± 0,8	3,87 ± 0,07
38	40,83 ± 0,13	19,6 ± 0,3	3,89 ± 0,05
40	39,240 ± 0,008	19,74 ± 0,02	4,35 ± 0,13
42	36,65 ± 0,19	21,3 ± 0,7	4,4 ± 0,2
44	33,45 ± 0,46	22,31 ± 0,14	4,5 ± 0,4
46	32,85 ± 0,09	23,11 ± 0,10	4,40 ± 0,11
48	32,78 ± 0,08	25,34 ± 0,12	5,05 ± 0,17
50	32,22 ± 0,17	26,2 ± 0,4	5,07 ± 0,02
52	29,73 ± 0,13	27,40 ± 0,19	4,97 ± 0,08
54	27,2 ± 0,6	29,2 ± 0,2	4,84 ± 0,06
56	25,8 ± 0,3	30,7 ± 0,5	4,78 ± 0,08
58	23,54 ± 0,10	30,8 ± 0,2	5,0 ± 0,2
60	22,6 ± 0,4	30,85 ± 0,06	4,92 ± 0,08
62	22,5 ± 0,3	30,8 ± 0,1	4,99 ± 0,09
64	22,51 ± 0,17	30,8 ± 0,3	4,95 ± 0,07
66	22,4 ± 0,4	30,83 ± 0,19	4,95 ± 0,12

Graf 32 - Průběh fermentace při pH 5



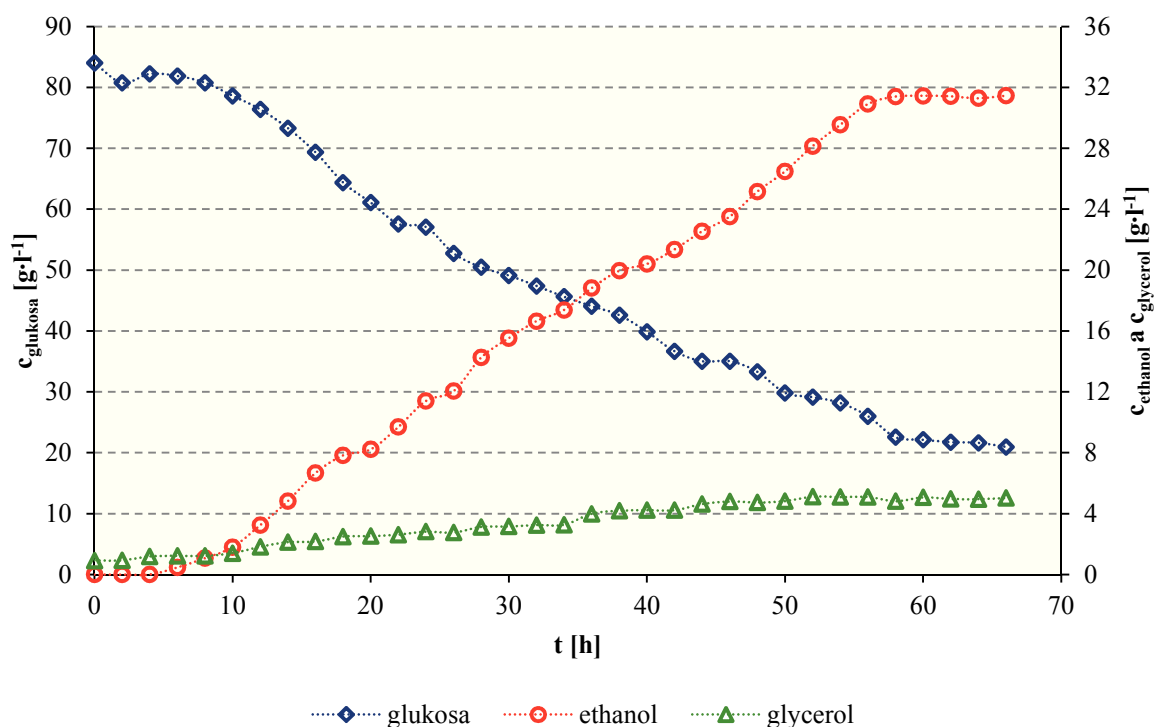
V tabulce 21 jsou uvedeny naměřené hodnoty koncentrací glukosy, ethanolu a glycerolu během fermentace zhydrolyzovaného chleba, u kterého bylo upraveno pH na hodnotu 5. Uvedené hodnoty jsou doplněny o intervaly spolehlivosti, které stejně jako u jednotlivých hydrolýz, nemohly být vyneseny do grafu jako chybové úsečky, jelikož byly příliš malé. Hodnoty naměřených koncentrací jsou vyneseny do grafu 32, kde lze pozorovat jejich změny s časem. Z grafu lze vyčíst, že koncentrace glukosy postupně klesala s časem, jelikož byla spotřebována částečně na růst buněk a především produkci metabolitů. Spotřeba glukosy se začala relativně ustalovat kolem 60. hodiny fermentace.

Je patrné, že s úbytkem glukosy se zvyšovala koncentrace ethanolu. Lze usuzovat, že konec produkce ethanolu nastal kolem 56. až 58. hodiny. Během fermentace nastala i produkce glycerolu, jehož koncentrace byla také stanovena a vynesena do grafu. Produkce glycerolu se po 40. hodině již výrazně neměnila.

Tabulka 22 - Naměřené hodnoty koncentrací glukosy, ethanolu a glycerolu během fermentace bez úpravy pH

čas [h]	$c_{\text{glukosa}} [\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	$c_{\text{ethanol}} [\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	$c_{\text{glycerol}} [\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$
0	$84,00 \pm 0,13$	-	$0,92 \pm 0,02$
2	$80,7 \pm 0,2$	-	$0,93 \pm 0,04$
4	$82,22 \pm 0,18$	-	$1,19 \pm 0,02$
6	$81,88 \pm 0,06$	$0,469 \pm 0,009$	$1,23 \pm 0,10$
8	$80,8 \pm 1,0$	$1,08 \pm 0,10$	$1,22 \pm 0,11$
10	$78,6 \pm 1,0$	$1,80 \pm 0,02$	$1,41 \pm 0,05$
12	$76,4 \pm 0,4$	$3,24 \pm 0,13$	$1,82 \pm 0,04$
14	$73,03 \pm 0,05$	$4,8 \pm 0,4$	$2,13 \pm 0,14$
16	$69,3 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,2$	$2,17 \pm 0,14$
18	$64,4 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,3$	$2,50 \pm 0,04$
20	$61,1 \pm 1,1$	$8,22 \pm 0,15$	$2,5 \pm 0,3$
22	$57,6 \pm 0,8$	$9,7 \pm 0,3$	$2,62 \pm 0,03$
24	$57,06 \pm 0,10$	$11,4 \pm 0,3$	$2,82 \pm 0,14$
26	$52,7 \pm 0,9$	$12,05 \pm 0,14$	$2,76 \pm 0,17$
28	$50,47 \pm 0,16$	$14,3 \pm 0,3$	$3,13 \pm 0,04$
30	$49,10 \pm 0,17$	$15,53 \pm 0,04$	$3,16 \pm 0,18$
32	$47,4 \pm 0,8$	$16,6 \pm 0,2$	$3,25 \pm 0,11$
34	$45,6 \pm 0,3$	$17,38 \pm 0,12$	$3,3 \pm 0,2$
36	$44,1 \pm 0,3$	$18,8 \pm 0,5$	$3,992 \pm 0,015$
38	$42,61 \pm 0,02$	$20,0 \pm 0,4$	$4,190 \pm 0,008$
40	$39,9 \pm 0,6$	$20,40 \pm 0,18$	$4,23 \pm 0,06$
42	$36,67 \pm 0,08$	$21,4 \pm 0,3$	$4,23 \pm 0,10$
44	$35,0 \pm 0,6$	$22,55 \pm 0,03$	$4,6 \pm 0,2$
46	$35,0 \pm 0,4$	$23,5 \pm 0,2$	$4,80 \pm 0,19$
48	$33,3 \pm 0,4$	$25,16 \pm 0,11$	$4,73 \pm 0,05$
50	$29,84 \pm 0,18$	$26,49 \pm 0,04$	$4,82 \pm 0,06$
52	$29,1 \pm 0,4$	$28,1 \pm 0,4$	$5,11 \pm 0,03$
54	$28,18 \pm 0,05$	$29,54 \pm 0,02$	$5,09 \pm 0,08$
56	$26,0 \pm 0,5$	$30,9 \pm 0,7$	$5,10 \pm 0,09$
58	$22,6 \pm 0,3$	$31,4 \pm 0,3$	$4,82 \pm 0,06$
60	$22,1 \pm 0,9$	$31,4 \pm 0,4$	$5,07 \pm 0,06$
62	$21,7 \pm 0,4$	$31,4 \pm 0,3$	$4,97 \pm 0,08$
64	$21,6 \pm 0,7$	$31,6 \pm 0,15$	$4,95 \pm 0,12$
66	$21,0 \pm 0,7$	$31,5 \pm 0,8$	$5,03 \pm 0,13$

Graf 33 - Průběh fermentace bez úpravy pH



V tabulce 22 a grafu 33 jsou uvedeny naměřené koncentrace glukosy, ethanolu a glycerolu u zhydrolyzovaného chleba bez následné úpravy pH. V tabulce jsou uvedeny k jednotlivým hodnotám intervaly spolehlivosti. Z grafu lze vyčíst, že obsah glukosy se postupně s časem snižoval a její spotřeba se ustálila kolem 58. až 60. hodiny. Zároveň s úbytkem glukosy docházelo k tvorbě ethanolu, jehož produkce byla pravděpodobně ukončena opět mezi 58. až 60. hodinou. S ethanolem se také tvořil glycerol, který během fermentace nedosahoval příliš vysokých hodnot a jeho tvorba ustala kolem 46. hodiny.

ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na studium možnosti využití odpadního pečiva k bioprodukcí vybraných metabolitů. Vybraným odpadním pečivem se stal pšenično-žitný chléb. Experimentální část byla zaměřena především na optimalizaci enzymatické hydrolýzy tak, aby škroby obsažené v odpadním chlebu byly co nejvíce rozštěpeny na jednoduché sacharidy. Produkty hydrolýzy byly použity na fermentaci a její optimalizaci k získání co nejvyššího množství ethanolu pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080.

Suchý starý chléb byl před hydrolýzou rozmělněn na menší části, které byly podrobeny síťové analýze částic. Po rozmělnění byla vytvořena suspenze chleba a vody, kde bylo vyzkoušeno několik druhů suspenzí o různé koncentraci částic a s různými velikostmi částic. Jako nejlepší byla vyhodnocena 15% w/v suspenze s velikostí částic menší jak 1,25 mm.

Jakmile byla nalezena suspenze vhodná pro enzymatickou hydrolýzu, byly aplikovány enzymy. V této práci byly použity enzymové preparáty BAN 240L (α -amylasa z *Bacillus amyloliquefaciens*) a AMG 300L (glukoamylasa z *Aspergillus niger*) od firmy Novozymes®. Bylo provedeno několik způsobů hydrolýz odpadního chleba pomocí těchto enzymů. Preparát BAN 240L byl použit na ztekucení odpadního chleba a preparát AMG 300L na sacharifikaci. U obou preparátů bylo zjišťováno optimální množství, pH a teplota.

Při ztekucení preparátem BAN 240L bylo vyhodnoceno jako optimální množství 12 μ l enzymu, pH 6 a teplota 80 °C. Za těchto podmínek vzniklo 67,08 g·l⁻¹ redukujících cukrů v přepočtu na maltosu. Výtěžky byly stanoveny spektrofotometrickou metodou podle Somogyi-Nelsona a vypočteny z rozdílu počáteční a konečné koncentrace redukujících cukrů. Z průběhu působení α -amylasy bylo dále zjištěno, že ztekucení probíhalo přibližně 180 minut.

Preparát AMG 300L byl aplikován po působení α -amylasy, vzhledem k vyšším výtěžkům glukosy a doporučení výrobce. Jako optimální množství tohoto enzymu bylo stanoveno 12 μ l, pH 4,2 a teplota 60 °C. V tomto případě vzniklo 70,75 g·l⁻¹ redukujících cukrů přepočtených na glukosu stanovených metodou Somogyi-Nelsona. Pro přesnější určení množství vzniklé glukosy byla provedena analýza metodou HPLC, kdy bylo stanoveno množství vzniklé glukosy na 70,28 g·l⁻¹. Sacharifikace glukoamylasou trvala zhruba 90 minut.

Pro zefektivnění hydrolýzy byla vyzkoušena metoda, kdy byly přidány oba enzymy najednou či postupně za jednoho zvoleného pH a dvou teplot, které byly použitelné pro oba preparáty. Byla tedy zvolena hodnota pH 5,5 a teplota 65 °C s mícháním a teplota 70 °C bez míchání. Nejvyššího výtěžku glukosy bylo dosaženo při postupném přidání enzymů za teploty 65 °C s mícháním, a to 67,94 g·l⁻¹ při stanovení metodou HPLC. Tato směsná hydrolýza byla i použita pro přípravu chleba před fermentací, jelikož výtěžek glukosy při této metodě nebyl výrazně nižší než u 2 krokové hydrolýzy. Navíc tato metoda trvala poloviční dobu a z ekonomického hlediska je výhodnější.

Po zjištění nejvhodnějšího způsobu enzymatické hydrolýzy, byla provedena fermentace kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Z růstových křivek byly určeny doba a jednotlivé fáze růstu, z čehož bylo vycházeno při přípravě inokula pro fermentaci. Před fermentací bylo inokulum naředěno na hodnotu OD = 0,5 a přidáno v množství 1:10 do hydrolyzátu. Pro fermentaci bylo u jednoho hydrolyzátu upraveno pH na hodnotu 5 a jeden hydrolyzát byl ponechán bez úpravy pH. Fermentace probíhala po dobu 66 hodin a bylo zjištěno, že produkce ethanolu ustala kolem 58. hodiny. Po vyhodnocení metodou HPLC bylo zjištěno, že větší množství ethanolu vzniklo z hydrolyzátu bez upraveného pH, a to 31,5 g·l⁻¹. Během fermentace docházelo i ke vzniku glycerolu, proto byl také stanoven. V obou případech

fermentace vzniklo kolem $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ glycerolu. Stanovení vzniklého glycerolu je důležité i z hlediska toho, že na každé procento glycerolu se ztrácí 0,5 % ethanolu.

LITERATURA

- [1] KOSSEVA, Maria R a Colin WEBB. *Food industry wastes: assessment and recuperation of commodities*. Singapore: Elsevier/Academic Press, c2013, xxvi, 312 p. ISBN 01-239-1921-5.
- [2] ODSTRČIL, Jaroslav a Milada ODSTRČILOVÁ. *Chemie potravin*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006, 164 s. ISBN 80-701-3435-6.
- [3] Světový den chleba v České republice. In: *Svaz pekařů* [online]. 2013 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.svazpekaru.cz/index.php/pro-novinare/svetovy-den-chleba-2013/353-svetovy-den-chleba>
- [4] Spotřeba potravin a nealkoholických nápojů (na obyvatele za rok). In: *Český statistický úřad* [online]. 2013 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: [http://www.czso.cz/csu/2013edicniplan.nsf/t/21002D4619/\\$File/21391301.pdf](http://www.czso.cz/csu/2013edicniplan.nsf/t/21002D4619/$File/21391301.pdf)
- [5] CHEN, P. L., Z. LONG, R. RUAN a T.P. LABUZA. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Water Mobility in Bread during Storage. *LWT - Food Science and Technology*. 1997, roč. 30, č. 2, 178—183. 0023-6438/97/020178. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643896901632>
- [6] MANDALA, I.G. Physical properties of fresh and frozen stored, microwave-reheated breads, containing hydrocolloids. *Journal of Food Engineering*. 2005, vol. 66, issue 3, s. 291-300. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.03.020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877404001438>
- [7] NEEDHAM, Rachel, James WILLIAMS, Nikki BEALES, Phil VOYSEY a Naresh MAGAN. Early detection and differentiation of spoilage of bakery products. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2005, vol. 106, issue 1, s. 20-23. DOI: 10.1016/j.snb.2004.05.032. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400504003909>
- [8] SUHR, K.I a P.V NIELSEN. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, vol. 95, issue 1, s. 67-78. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160504000868>
- [9] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [10] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [11] Extruze. In: *A-Z slovník pro spotřebitele* [online]. 2013 [cit. 2014-03-22]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92012.aspx>
- [12] KADLEC, Pavel. a kol. *Procesy potravinářských a biochemických výrob*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2003, 308 s. ISBN 80-708-0527-7.
- [13] LUDVÍK, Miloslav. *Laboratorní cvičení z chemického inženýrství*. 4. přepr.vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000, Přer.str. ISBN 80-708-0404-1.

- [14] AGRAWAL, Manoj, S. PRADEEP, K. CHANDRARAJ a Sathyanarayana N. GUMMADI. Hydrolysis of starch by amylase from *Bacillus* sp. KCA102: a statistical approach. *Process Biochemistry*. 2005, roč. 40, č. 7, s. 2499-2507. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.10.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959204004431>
- [15] GOYAL, Nidhi, J.K. GUPTA a S.K. SONI. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005, roč. 37, č. 7, s. 723-734. DOI: 10.1016/j.enzmitec.2005.04.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014102290500195X>
- [16] VAN DER MAAREL, Marc J.E.C, Bart VAN DER VEEN, Joost C.M UITDEHAAG, Hans LEEMHUIS a L DIJKHUIZEN. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*. 2002, vol. 94, issue 2, s. 137-155. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00407-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165601004072>
- [17] SINGH, Jaspreet, Lovedeep KAUR a O.J. MCCARTHY. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids*. 2007, roč. 21, č. 1, s. 1-22. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2006.02.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X0600049X>
- [18] VOET, Donald a Judith G VOET. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2011, 1428, 53 p. ISBN 04-709-1745-8.
- [19] VASANTHAN, T; BHATTY, R. S. Physicochemical Properties of Small- and Large-Granule Starches of Waxy, Regular, and High-Amylose Barleys. *Cereal Chemistry*. 1996, roč. 73, č. 2, s. 199-207.
- [20] HOSENEY, R. *Principles of cereal science and technology*. 2nd ed. St. Paul, Minn.: American Association of Cereal Chemists, 1994, 378 p. ISBN 09-132-5079-1.
- [21] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M. *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko- technologická v Praze, 2004. 203 s. ISBN 80-7080-530-7.
- [22] Kadlec, P., a kol. *Technologie sacharidů*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko- technologická, 2000. 138 s. ISBN 80-7080-400-9.
- [23] JAMES N. BEMILLER, James N. Roy L. *Starch: chemistry and technology*. 3rd ed. London: Academic, 2009. ISBN 978-012-7462-752.
- [24] MELZUCH, Karel a Mojmír RYCHTERA. Lihovarnictví a výroba lihovin. In: *Sylaby VŠCHT* [online]. 2010 [cit. 2014-03-22]. Dostupné z: <http://oclanky.moachem.cz/soubory/adresar/lihoviny.pdf>
- [25] RYCHTERA, Mojmír, Jan PÁČA a Jiří UHER. *Lihovarství, droždářství a vinařství*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 2 sv., 126 s.
- [26] ASGHAR, Muhammad, Umbreen AZHAR, S. RAFIQ. Production of α -Amylase by *Arachniotus* sp. using Waste Bread Medium. *International journal of agriculture and biology*. 2002, roč. 4, č. 1.

- [27] DAS, Shipra; SINGHT, Surendra; SHARMA, Vinni; SONI, Manohar Lal. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *SOURCE International Journal of Pharma & Bio Science* [online]. 2011, roč. 2, č. 1 [cit. 2014-02-17]. Dostupné z: http://ijpbs.net/volume2/issue1/pharma/_48.pdf
- [28] KANDRA, Lili. Alfa-Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2003, 666-667, s. 487-498. DOI:10.1016/j.theochem.2003.08.073. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166128003007073>
- [29] IULEK, Jorge, Octávio Luiz FRANCO, Márcio SILVA, Christiane Trevisan SLIVINSKI, Carlos BLOCH, Daniel John RIGDEN a Maria Fátima GROSSI DE SÁ. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). *The International Journal of Biochemistry*. 2000, vol. 32, 11-12, s. 1195-1204. DOI: 10.1016/S1357-2725(00)00053-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272500000534>
- [30] TANGPHATSORNRUANG, Sithichoke, Maliwan NACONSIE, Chinae THAMMARONGTHAM a Jarunya NARANGAJAVANA. Isolation and characterization of an α -amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005, vol. 43, issue 9, s. 821-827. DOI: 10.1016/j.plaphy.2005.07.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942805002081>
- [31] WHITCOMB, David C. a Mark E. LOWE. Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Digestive Diseases and Sciences*. 2007-1-11, vol. 52, issue 1, s. 1-17. DOI: 10.1007/s10620-006-9589-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10620-006-9589-z>
- [32] BRAYER, Gary D., Yaoguang LUO a Stephen G. WITHERS. The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science*. 1995, vol. 4, issue 9, s. 1730-1742. DOI: 10.1002/pro.5560040908. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pro.5560040908>
- [33] MACGREGOR, E. a C. GREENWOOD. *Polymers in nature*. New York: J. Wiley, c1980, vii, 391 p. ISBN 04-712-7762-2.
- [34] MONTEIRO DE SOUZA, Paula a Pérola DE OLIVEIRA E MAGALHAES. Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, roč. 41, č. 4. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S15173822010000400004&script=sci_arttext
- [35] MURALIKRISHNA, G. a M. NIRMALA. Cereal α -amylases—an overview. *Carbohydrate Polymers*. 2005, vol. 60, issue 2, s. 163-173. DOI: 10.1016/j.carbpol.2004.12.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486170400462X>
- [36] PANDEY, Ashok, Poonam NIGAM, Carlos R. SOCCOL, Vanete T. SOCCOL, Dalel SINGH a Radjiskumar MOHAN. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2000, vol. 31, issue 2, s. 135-304. DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/ba19990073>.

- [37] LABELLE, P., et al. Comparative study of wheat flour saccharification and ethanol production with two glucoamylase preparations. *Industrial Crops and Products*. August 1997, vol. 6, issues 3-4, s. 291-295. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T77-3WDCG5VG/2/7a043a4260ade77b9d3018abb2f7cfd8>>. ISSN 0926-6690, DOI: 10.1016/S0926-6690(97)00020-4.
- [38] SAUER, Jørgen, Bent W. SIGURSKJOLD, Ulla CHRISTENSEN, Torben P. FRANDSEN, Ekaterina MIRGORODSKAYA, Matt HARRISON, Peter ROEPSTORFF a Birte SVENSSON. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000, vol. 1543, issue 2, s. 275-293. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00232-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00232-6).
- [39] LEE, Jaeyong a Mark PAETZEL. Structure of the catalytic domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*. 2011, vol. 67, issue 2, s. 188-192. DOI: 10.1107/S1744309110049390. Dostupné z: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S1744309110049390>
- [40] REBROŠ, Martin, Michal ROSENBERG, KRIŠTOFÍKOVÁ a STLOUKAL. Mikrobiálna produkcia palivového ethanolu: bakterie alebo kvasinky?. *Chemické listy*. 2005, č. 99. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_06_402-409.pdf
- [41] NOVOZYMES. *Enhancing alcohol production with enzymes*. 2001. Dostupné z: <http://www.mountainmoonshine.com/images/2001-10782.pdf>
- [42] *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycobank in English* [online]. 2014 [cit. 2014-03-29]. Dostupné z: http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=492492
- [43] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [44] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-726-2341-9.
- [45] WALKER, Graeme M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 1998, 350 s. ISBN 04-719-6446-8.
- [46] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1.
- [47] RYCHTERA, Mojmír a Jan PÁCA. *Bioinženýrství kvasných procesů*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985, 154 s.
- [48] Bacterial Growth Curve (Theory). *Amrita Vishwa Vidyapeetham Virtual Lab* [online]. 2014 [cit. 2014-03-19]. Dostupné z: <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=73&sim=1105&cnt=1>
- [49] HROMÁDKO, Jan, Jiří HROMÁDKO, Petr MILLER, Vladimír HÖNIG a Pavel ŠTĚRBA. Výroba bioethanolu. *Listy lihovarnické a řepařské*. 2010, č. 126. Dostupné z: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/267-271.PDF
- [50] JAN HROMÁDKO, JIŘÍ HROMÁDKO, P. MILER, V. HÖNIG, AND P. ŠTĚRBA. Využití bioethanolu jako paliva ve spalovacích motorech. *Chemické listy*. 2011, vol.105, issue 2, s. 122-128. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_02_122-128.pdf

- [51] MITTAL, Ashutosh a Stephen R. DECKER. Special issue: Application of biotechnology for biofuels. 3 *Biotech.* 2013, vol. 3, issue 5, s. 341-343. DOI: 10.1007/s13205-013-0122-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-013-0122-8>
- [52] OLUGBENGA, Awolu a Ibileke IBIYEMI. Bioethanol production from brewer's spent grain, bread wastes and corn fiber. *African Journal of Food Science*. 2011, roč. 5, č. 3. Dostupné z: http://www.academicjournals.org/article/article1379516213_Olugbenga%20et%20al.pdf
- [53] HROMÁDKO, Jan, Jiří HROMÁDKO, Petr MILER, Vladimír HÖNIG a Martin CINDR. Technologie výroby biopaliv druhé generace. *Chemické listy*. 2010, č. 104. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_08_784-790.pdf
- [54] Biopaliva druhé a třetí generace. *3pól - Magazín plný pozitivní energie* [online]. 2012 [cit. 2014-03-29]. Dostupné z: <http://3pol.cz/1258-biopaliva-druhe-a-treti-generace>
- [55] LENTIKAT'S BIOTECHNOLOGIES. *Biotechnologie lentikats a její uplatnění při výrobě bioetanolu: Výroba bioetanolu z cukernaté, škrobnaté a lignocelulózové suroviny*. 2010. Dostupné z: <http://www.lentikats.eu/soubory/ostatni/lentikats-etanol-cj.pdf>
- [56] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [57] NIELSEN, Suzanne S. *Food analysis*. 4. vyd. New York: Springer, 2010. ISBN 978-1-4418-1477-4.
- [58] WROLSTAD, Ronald E. *Handbook of food analytical chemistry*. [Online-Ausg.]. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience, 2000. ISBN 04-717-2187-5.
- [59] WORSFOLD, Paul, Alan TOWNSHEND a Colin POOLE. *Encyclopedia of analytical science*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. ISBN 978-012-3693-976.
- [60] ŠTERN, P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2006, roč. 14, č. 3 [cit. 2014-03-17], s. 146-151. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>
- [61] MORAIS, Inês P. A., Ildikó V. TÓTH a António O. S. S. RANGEL. Turbidimetric and Nephelometric Flow Analysis: Concepts and Applications. *Spectroscopy Letters* [online]. 2006, vol. 39, issue 6, s. 547-579 [cit. 2014-03-18]. DOI: 10.1080/00387010600824629. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00387010600824629>
- [62] SOMMER, Lumír et al. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [63] TISSUE, Brian. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). In: *Chemistry Hypermedia Project* [online]. 2000 [cit. 2014-03-18]. Dostupné z: <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/sep/lc/hplc.html>
- [64] HPLC - High Performance Liquid Chromatography. WATERS. *What Is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)?* [online]. 2012 [cit. 2014-03-18]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919&locale=en_CZ
- [65] EBRAHIMI, F, M KHANAHMADI, S ROODPEYMA a M TAHERZADEH. Ethanol production from bread residues. *Biomass and Bioenergy*. 2008, vol. 32, issue 4, s. 333-337. DOI: 10.1016/j.biombioe.2007.10.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953407001936>

- [66] Effect of Physical Parameters on Second Generation Bio-Ethanol Production from Oil Palm Frond by *Saccharomyces cerevisiae*. *Effect of Physical Parameters on Second Generation Bio-Ethanol Production from Oil Palm Frond by Saccharomyces cerevisiae*. 2013, č. 8. Dostupné z: http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_08_1_969_Lim_Bioethanol_Oil_Palm_Frond/1939
- [67] Amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* liquid. SIGMA-ALDRICH CO. *Sigma-Aldrich* [online]. 2014 [cit. 2014-03-17]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a7595?lang=en®ion=CZ>
- [68] SLOMIŃSKA, Lucyna, Danuta WIŚNIEWSKA a Anna GRZEŚKOWIAK. Liquefaction of starch by thermostable alpha-amylase. *Acta Sci. Pol.* 2003, č. 2. Dostupné z: http://www.food.actapol.net/pub/2_2_2003.pdf
- [69] Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. SIGMA-ALDRICH CO. *Sigma-Aldrich* [online]. 2014 [cit. 2014-03-17]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a7095?lang=en®ion=CZ>
- [70] NOVOZYMES. *Efficient and quick saccharification*. 2004. Dostupné z: <http://www.mountainmoonshine.com/images/Saccharification.pdf>
- [71] CNCTC 6646 Strain Browser. *Straininfo* [online]. 2014 [cit. 2014-03-27]. Dostupné z: <http://www.straininfo.net/strains/724430/browser>
- [72] ZAJONCOVÁ, Ludmila a Marek ŠEBELA. Amylasy - význam stanovení jejich aktivity. *Chem. listy*. 2007, č. 101.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>A.niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
AGU	amyloglukosidase unit
AMG 300L	glukoamylasa z <i>Aspergillus niger</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BAN 240L	α -amylasa z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
D-izomer.....	pravotočivý izomer
EMP.....	Embden-Meyerhof-Parnas
EU.....	Evropská unie
GA-1	glukoamylasa 1
GA-2.....	glukoamylasa 2
HPLC.....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ISO	Mezinárodní organizace pro standardizaci
KDPG	2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát
KNU	Kilo Novo Units α -amylase
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
obj. %	objemová procenta
OD	optická hustota
RID	Refractive Index Detector (refraktometrický detektor)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
UV/VIS.....	ultrafiolové a viditelné spektrum

SEZNAM POUŽITÝCH VELIČIN

A	plocha píku	[mV·s]
μ	měrná růstová rychlost	[h ⁻¹]
X	koncentrace biomasy	[g·dm ⁻³]
t	čas	[h] nebo [min]
I_t	intenzita prošlého záření	[-]
I_0	intenzita světelného zdroje	[-]
τ	turbiditní koeficient	[-]
l	optická dráha kyvety	[-]
c	hmotnostní koncentrace	[g·l ⁻¹]
OD	optická hustota	[-]
λ	vlnová délka	[nm]

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Struktura α -D-glukopyranosy v 4C_1 (židličkové) konformaci	15
Obrázek 2 - Struktura amylosy [10]	15
Obrázek 3 - Struktura amylopektinu [10]	16
Obrázek 4 - Škrobová zrna typu A a B [19]	16
Obrázek 5 - Elektronový mikrosnímek škrobových zrn pšeničného škrobu [20]	17
Obrázek 6 - Různé enzymy podílející se na degradaci škrobu [16]	19
Obrázek 7 - Schématické znázornění působení α -amylasy na amylosu a amylopektin [33]	20
Obrázek 8 - Struktura α -amylasy[34]	21
Obrázek 9 - Struktura glukoamylasy [38]	22
Obrázek 10 - Taxonomické zařazení rodu <i>Saccharomyces</i> [42]	24
Obrázek 11 - Růstová křivka [48]	28
Obrázek 12 - Technologické postupy výroby biopaliv 1. a 2. generace,	30
Obrázek 13 - Obecné schéma výroby ethanolu ze škrobnatých surovin [55]	31
Obrázek 14 - Schéma měření turbidity vzorku [59]	32
Obrázek 15 - Schématické znázornění HPLC přístroje [64]	34
Obrázek 16 - Hodnoty pH a množství enzymů v jednotlivých baňkách pro jednu teplotu	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Eluotropní řada [62].....	33
Tabulka 2 - Enzymová aktivita preparátu BAN 240L, doporučené pH, teplota a dávkování [41].....	35
Tabulka 3 - Teplotní a pH optimum preparátu BAN 240L [41]	35
Tabulka 4 - Doporučené pH, teplota a dávkování enzymového preparátu AMG 300L [70]	35
Tabulka 5 - Tabulka navážek jednotlivých složek média na 1000 ml vody	38
Tabulka 6 - Příprava kalibrační řady jednotlivých složek.....	38
Tabulka 7- Příprava kalibrační řady jednotlivých složek.....	39
Tabulka 8 - Naměřené hodnoty optické hustoty	44
Tabulka 9 - Hmotnostní distribuce velikosti částic	45
Tabulka 10 - Hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ vzniklých redukujících cukrů v průběhu ztekucení při teplotě 70 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti.....	46
Tabulka 11 - Hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ vzniklých redukujících cukrů v průběhu ztekucení při teplotě 80 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti.....	49
Tabulka 12 - Hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ vzniklých redukujících cukrů v průběhu ztekucení při teplotě 90 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti.....	52
Tabulka 13 - Hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ vzniklých redukujících cukrů při teplotě 55 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti (metoda Somogyi-Nelsona).....	56
Tabulka 14 - Hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ vzniklých redukujících cukrů při teplotě 60 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti (metoda Somogyi-Nelsona).....	59
Tabulka 15 - Hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ vzniklých redukujících cukrů při teplotě 65 °C za různého pH a množství enzymu s intervaly spolehlivosti	62
Tabulka 16 - Hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ vzniklé glukosy při sacharifikaci s intervaly spolehlivosti zjištěné metodou HPLC	66
Tabulka 17 - Naměřené hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ redukujících cukrů s intervaly spolehlivosti při směsné hydrolýze 1	69
Tabulka 18 - Naměřené hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ redukujících cukrů s intervaly spolehlivosti při směsné hydrolýze 2 - pouze α -amylasa.....	70
Tabulka 19 - Naměřené hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ redukujících cukrů s intervaly spolehlivosti při směsné hydrolýze 2 - oba enzymy.....	70
Tabulka 20 - Naměřené hodnoty koncentrací $[g \cdot l^{-1}]$ redukujících cukrů s intervaly spolehlivosti při obou způsobech hydrolýzy (metoda HPLC)	72
Tabulka 21 - Naměřené hodnoty koncentrací glukosy, ethanolu a glycerolu během fermentace s pH 5	74

Tabulka 22 - Naměřené hodnoty koncentrací glukosy, ethanolu a glycerolu během fermentace bez úpravy pH.....	76
---	----

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Závislost optické hustoty na čase	45
Graf 2 - Hmotnostní distribuce velikosti částic.....	46
Graf 3 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (70 °C; pH 5,0).....	48
Graf 4 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (70 °C; pH 6,0).....	48
Graf 5 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (70 °C; pH 7,0).....	49
Graf 6 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (80 °C; pH 5,0).....	51
Graf 7 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (80 °C; pH 6,0).....	51
Graf 8 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (80 °C; pH 7,0).....	52
Graf 9 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (90 °C; pH 5,0).....	53
Graf 10 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (90 °C; pH 6,0).....	54
Graf 11 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při ztekucení (90 °C; pH 7,0).....	54
Graf 12 - Srovnání výtěžku redukujících sacharidů při ztekucení vzhledem k množství enzymu.....	55
Graf 13 - Srovnání výtěžku redukujících sacharidů při ztekucení vzhledem k teplotě a hodnotě pH	56
Graf 14 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (55 °C; pH 3,2).....	58
Graf 15 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (55 °C; pH 4,2).....	58
Graf 16 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (55 °C; pH 5,2).....	59
Graf 17 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (60 °C; pH 3,2).....	60
Graf 18 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (60 °C; pH 4,2).....	61
Graf 19 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (60 °C; pH 5,2).....	61
Graf 20 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (65 °C; pH 3,2).....	63
Graf 21 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (65 °C; pH 4,2).....	63
Graf 22 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při sacharifikaci (65 °C; pH 5,2).....	64
Graf 23 - Srovnání výtěžku redukujících sacharidů při sacharifikaci vzhledem k množství enzymu (metoda Somogyi-Nelsona)	65
Graf 24 - Srovnání výtěžku redukujících sacharidů při sacharifikaci vzhledem k teplotě a hodnotě pH (metoda Somogyi-Nelsona)	66
Graf 25 - Srovnání výtěžku glukosy při sacharifikaci vzhledem k množství enzymu (metoda HPLC)	68
Graf 26 - Srovnání výtěžku glukosy při sacharifikaci vzhledem k teplotě a hodnotě pH (metoda HPLC)	68
Graf 27 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při směsné hydrolýze 1	69
Graf 28 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při směsné hydrolýze 2 - pouze α - amylasa	70
Graf 29 - Průběh vzniku redukujících sacharidů při směsné hydrolýze 2 - oba enzymy	71
Graf 30 - Srovnání výtěžku redukujících sacharidů při různých způsobech hydrolýzy (metoda Somogyi-Nelsona)	72

Graf 31 - Srovnání výtěžku glukosy při různých způsobech směsné hydrolýzy (metoda HPLC)	73
Graf 32 - Průběh fermentace při pH 5	75
Graf 33 - Průběh fermentace bez úpravy pH.....	77

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I - Kalibrační křivky - metoda Somogyi-Nelson

Příloha II - Kalibrační křivky - metoda HPLC

PŘÍLOHA I

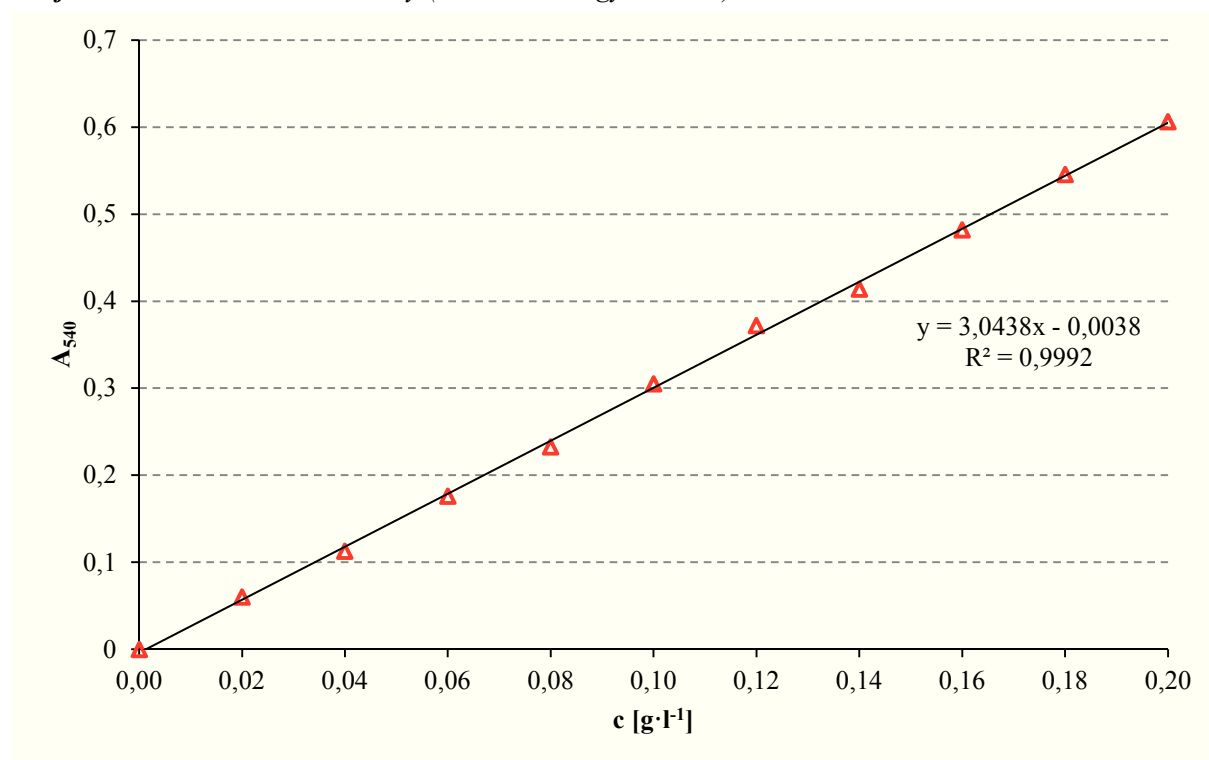
Kalibrační křivky - metoda Somogyi-Nelson

Kalibrační křivky pro maltosu a glukosu byly stanoveny metodou Somogyi-Nelsona uvedeného v kapitole 2.2.3. U každého vzorku byla proměřena absorbance třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán interval spolehlivosti (tabulky 1 a 2). Kalibrační křivky a rovnice lineární regrese, pomocí které byly vypočítány koncentrace jednotlivých látek, jsou uvedeny v grafech 1 a 2.

Tabulka 1 - Kalibrační křivka maltosy (metoda Somogyi-Nelson)

c [g·l ⁻¹]	A ₅₄₀
0	0
0,02	0,0603±0,0005
0,04	0,1127±0,0005
0,06	0,1760±0,0009
0,08	0,2327±0,0005
0,10	0,305±0,004
0,12	0,3720±0,0009
0,14	0,4140±0,0009
0,16	0,482±0,005
0,18	0,546±0,007
0,20	0,6063±0,0005

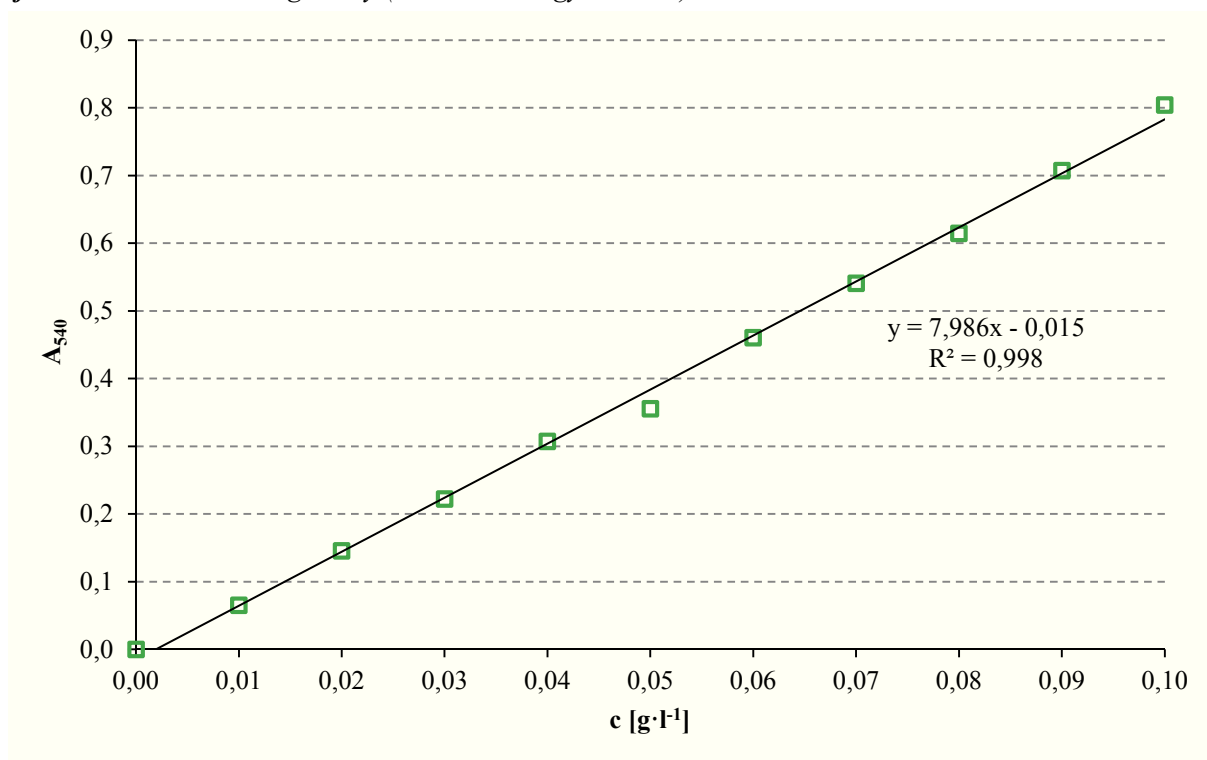
Graf 1 - Kalibrační křivka maltosy (metoda Somogyi-Nelson)



Tabulka 2 - Kalibrační křivka glukosy (metoda Somogyi-Nelson)

c [g·l⁻¹]	A₅₄₀
0	0
0,01	0,0653 ± 0,0019
0,02	0,146 ± 0,003
0,03	0,222 ± 0,003
0,04	0,3073 ± 0,0019
0,05	0,355 ± 0,017
0,06	0,460 ± 0,005
0,07	0,5410 ± 0,0009
0,08	0,6143 ± 0,0011
0,09	0,707 ± 0,002
0,10	0,804 ± 0,006

Graf 2 - Kalibrační křivka glukosy (metoda Somogyi-Nelson)



PŘÍLOHA II

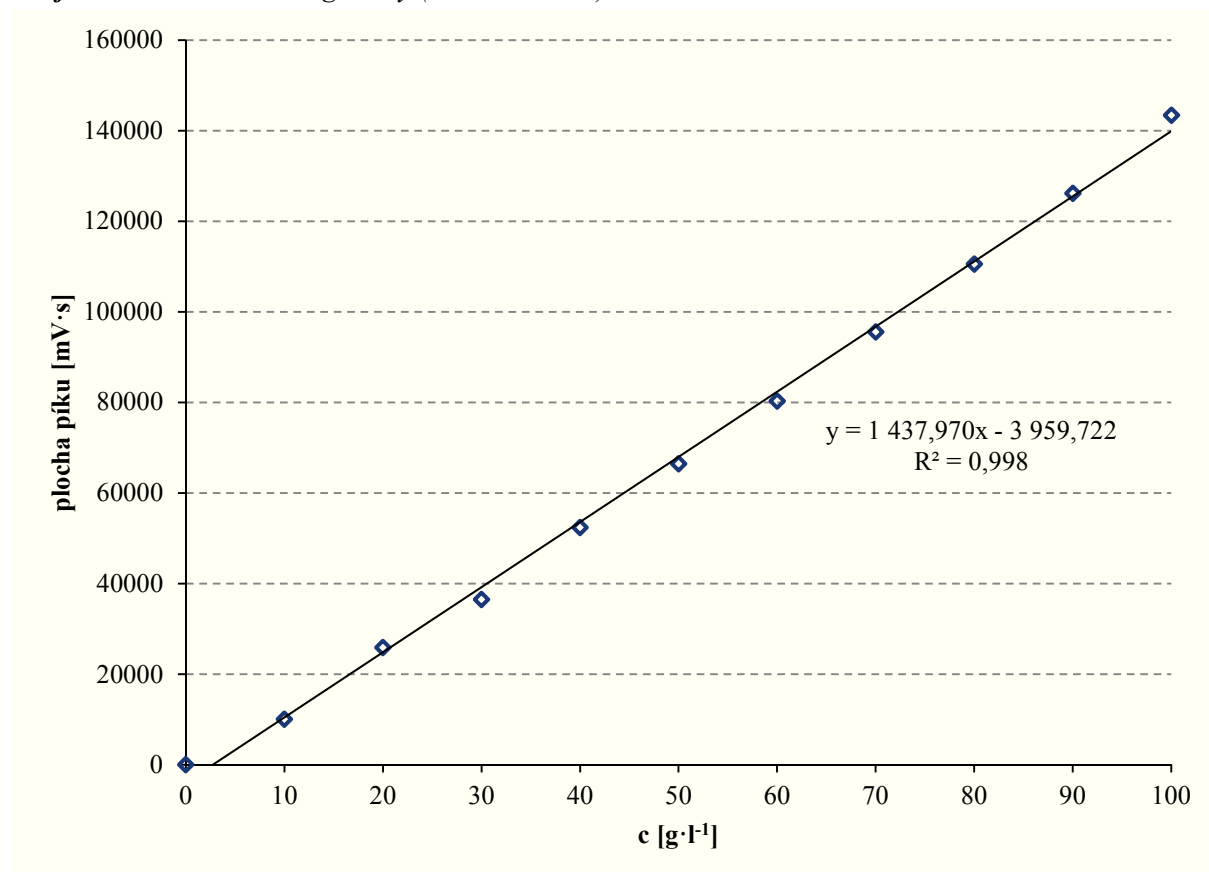
Kalibrační křivky - metoda HPLC

Kalibrační křivky pro glukosu, ethanol a glycerol byly stanoveny metodou HPLC pomocí RI detektoru podle postupu uvedeného v kapitole 2.2.6. U každého vzorku byly provedeny 3 nástřiky a ze získaných hodnot byl vypočítán interval spolehlivosti. Výsledky včetně intervalů spolehlivosti jsou uvedeny v tabulkách 1, 2 a 3. Kalibrační křivky a rovnice lineární regrese, pomocí které byly vypočítány koncentrace jednotlivých látek, jsou uvedeny v grafech 1, 2 a 3.

Tabulka 1 - kalibrační křivka glukosy (metoda HPLC)

c [g·l ⁻¹]	A [mV·s]
0	0
10	10062 ± 97
20	25871 ± 43
30	36491 ± 14
40	52399 ± 92
50	66472 ± 16
60	80290 ± 56
70	95570 ± 38
80	110547 ± 101
90	126193 ± 12
100	143433 ± 6

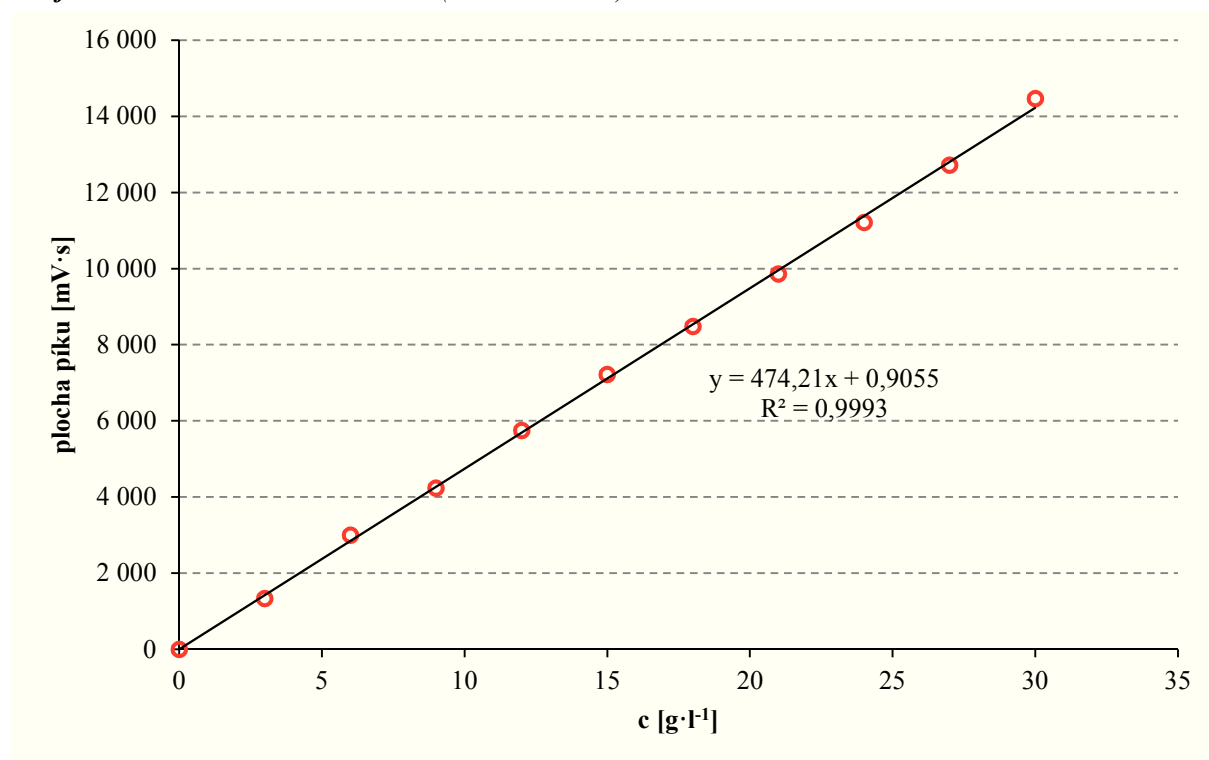
Graf 1 - kalibrační křivka glukosy (metoda HPLC)



Tabulka 2 - Kalibrační křivka ethanolu (metoda HPLC)

c [g·l⁻¹]	A [mV·s]
0	0
3	1331 ± 8
6	2999 ± 13
9	4234 ± 2
12	5744 ± 12
15	7215 ± 16
18	8481 ± 3
21	9861 ± 7
24	11208 ± 72
27	12717 ± 92
30	14465 ± 102

Graf 2 - Kalibrační křivka ethanolu (metoda HPLC)



Tabulka 3 - Kalibrační křivka glycerolu (metoda HPLC)

c [g·l⁻¹]	A [mV·s]
0	0
1	596 ± 8
2	1071 ± 14
3	1747 ± 49
4	2273 ± 92
5	3073 ± 3
6	3768 ± 12
7	4368 ± 83
8	5193 ± 24
9	5701 ± 17
10	6369 ± 6

Graf 3 - Kalibrační křivka glycerolu (metoda HPLC)

